

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

PCT

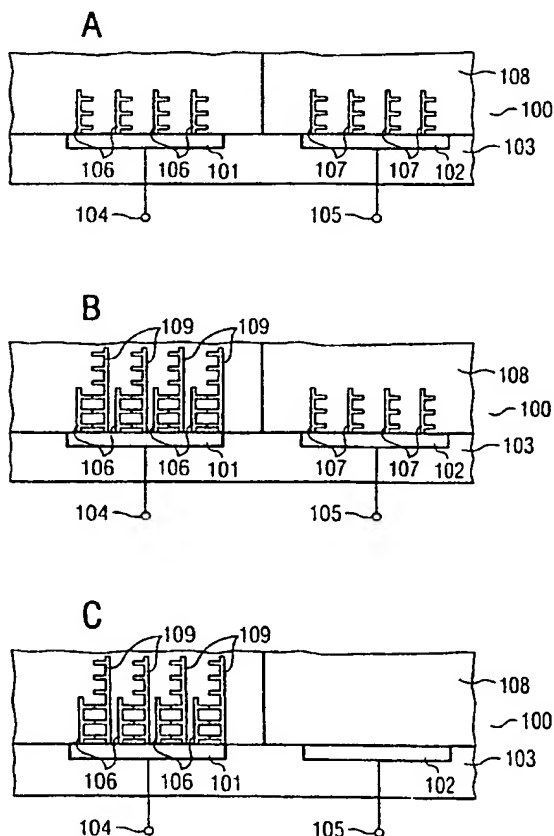
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/75151 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68** (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **INFINEON TECHNOLOGIES AG** [DE/DE]; St.-
Martin-Strasse 53, 81669 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/01244**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
29. März 2001 (29.03.2001) (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HOFMANN, Franz**
[DE/DE]; Herbergstrasse 25 B, 80995 München (DE).
LUYKEN, Richard, Johannes [DE/DE]; Boecklerweg
28, 81825 München (DE).
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch** (74) **Anwalt: VIERING, JENTSCHURA & PARTNER;**
Steinsdorfstrasse 6, 80504 München (DE).
- (30) Angaben zur Priorität:
100 15 819.6 30. März 2000 (30.03.2000) **DE** (81) Bestimmungsstaaten (national): **JP, US.**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **METHOD FOR DETECTING MACROMOLECULAR BIOPOLYMERS BY MEANS OF AN ELECTRODE
ARRANGEMENT**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM ERFASSEN VON MAKROMOLEKULAREN BIOPOLYMEREN MITTELS EINER
ELEKTRODENANORDNUNG**



(57) Abstract: The invention relates to electrodes which are provided with molecules that can bind macromolecular biopolymers. A first electric measurement is carried out on the electrodes. A medium is contacted to said electrodes in such a way that biopolymers can specifically bind to first molecules or second molecules which are applied to the electrodes, when macromolecular biopolymers are present in the medium. Unbound first or second molecules are removed from the respective electrode and a second electric measurement is carried out. The macromolecular biopolymers are detected according to the measurements.

(57) Zusammenfassung: Die Elektroden sind mit Molekülen versehen, die makromolekulare Biopolymere binden können. Es wird eine erste elektrische Messung an den Elektroden durchgeführt. Ein Medium wird mit den Elektroden in Kontakt gebracht, derart, dass für den Fall, dass sich in dem Medium makromolekulare Biopolymere befinden, sich diese an auf den Elektroden aufgebrachte erste Moleküle oder zweite Moleküle spezifisch binden können. Nicht gebundene erste oder zweite Moleküle werden von der jeweiligen Elektrode entfernt und es wird eine zweite elektrische Messung durchgeführt. Abhängig von den Messungen werden die makromolekularen Biopolymere erfasst.

BEST AVAILABLE COPY



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Beschreibung

Verfahren zum Erfassen von makromolekularen Biopolymeren mittels einer Elektrodenanordnung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erfassen von makromolekularen Biopolymeren mittels einer Elektrodenanordnung.

Ein solches Verfahren ist aus [1] bekannt.

10

Fig.2a und Fig.2b zeigen einen solchen Sensor, wie er in [1] beschrieben ist. Der Sensor 200 weist zwei Elektroden 201, 202 aus Gold auf, die in einer Isolatorschicht 203 aus Isolatormaterial eingebettet sind. An die Elektroden 201, 202 sind Elektroden-Anschlüsse 204, 205 angeschlossen, an denen das an der Elektrode 201, 202 anliegende elektrische Potential zugeführt werden kann. Die Elektroden 201, 202 sind als Planarelektroden angeordnet. Auf jeder Elektrode 201, 202 sind DNA-Sondenmoleküle 206 immobilisiert (vgl. Fig.2a). Die Immobilisierung erfolgt gemäß der sogenannten Gold-Schwefel-Kopplung. Auf den Elektroden 201, 202 ist der zu untersuchende Analyt, beispielsweise ein Elektrolyt 207, aufgebracht.

25

Sind in dem Elektrolyt 207 DNA-Stränge 208 mit einer Sequenz enthalten, die zu der Sequenz der DNA-Sondenmoleküle komplementär ist, so hybridisieren diese DNA-Stränge 208 mit den DNA-Sondenmolekülen 206 (vgl. Fig.2b).

30

Eine Hybridisierung eines DNA-Sondenmoleküls 206 und eines DNA-Strangs 208 findet nur dann statt, wenn die Sequenzen des jeweiligen DNA-Sondenmoleküls 206 und des entsprechenden DNA-Strangs 208 zueinander komplementär sind. Ist dies nicht der Fall, so findet keine Hybridisierung statt. Somit ist ein DNA-Sondenmolekül einer vorgegebenen Sequenz jeweils nur in der Lage einen bestimmten, nämlich den DNA-Strang mit jeweils komplementärer Sequenz zu binden, d.h. zu hybridisieren.

35

Findet eine Hybridisierung statt, so verändert sich, wie aus Fig.2b ersichtlich, der Wert der Impedanz zwischen den Elektroden 201 und 202. Diese veränderte Impedanz wird durch Anlegen einer Wechselspannung mit einer Amplitude von ungefähr 50 mV an die Elektroden-Anschlüsse 204, 205 und dem dadurch resultierenden Strom mittels eines angeschlossenen Messgeräts (nicht dargestellt) bestimmt.

Im Falle einer Hybridisierung verringert sich der kapazitive Anteil der Impedanz zwischen den Elektroden 201, 202. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sowohl die DNA-Sondenmoleküle 206 als auch die DNA-Stränge 208, die eventuell mit den DNA-Sondenmolekülen 206 hybridisieren, nicht-leitend sind und somit anschaulich die jeweilige Elektrode 201, 202 in gewissem Maße elektrisch abschirmen.

Zur Verbesserung der Messgenauigkeit ist es aus [4] bekannt, eine Vielzahl von Elektrodenpaaren 201, 202 zu verwenden und diese parallel zu schalten, wobei diese anschaulich miteinander verzahnt angeordnet sind, so dass sich eine sogenannte Interdigitalelektrode 300 ergibt. Die Abmessung der Elektroden und der Abstände zwischen den Elektroden liegen in der Größenordnung der Länge der zu detektierenden Moleküle, d.h. der DNA-Stränge 208 oder darunter, beispielsweise im Bereich von 200 nm und darunter.

Aus [2] ist eine weitere Vorgehensweise zum Untersuchen des Elektrolyt hinsichtlich der Existenz eines DNA-Strangs mit vorgegebener Sequenz bekannt. Bei dieser Vorgehensweise werden die DNA-Stränge mit der gewünschten Sequenz markiert und aufgrund der Reflexionseigenschaften der markierten Moleküle wird deren Existenz bestimmt. Hierzu wird Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich auf das Elektrolyt gestrahlt und das von dem Elektrolyt, insbesondere von dem nachzuweisenden DNA-Strang, reflektierte Licht wird erfasst. Aufgrund des Reflexionsverhaltens, d.h. insbesondere aufgrund der erfassten, reflektierten Lichtstrahlen wird bestimmt, ob der nachzuwei-

sende DNA-Strang mit der entsprechend vorgegebenen Sequenz in dem Elektrolyt enthalten ist oder nicht.

Diese Vorgehensweise ist sehr aufwendig, da eine sehr genaue Kenntnis über das Reflexionsverhalten des entsprechenden markierten DNA-Strangs erforderlich ist und weiterhin eine Markierung der DNA-Stränge vor Beginn des Verfahrens notwendig ist.

Weiterhin ist eine sehr genaue Justierung des Erfassungsmittels zum Erfassen der reflektierten Lichtstrahlen erforderlich, damit die reflektierten Lichtstrahlen überhaupt erfasst werden können.

Somit ist diese Vorgehensweise teuer, kompliziert sowie gegen Störeinflüsse sehr empfindlich, wodurch das Messergebnis sehr leicht verfälscht werden kann.

Ferner ist es aus der Affinitätschromatographie ([3]) bekannt, immobilisierte niedermolekulare Moleküle, insbesondere Liganden hoher Spezifität und Affinität, zu verwenden, um Peptide und Proteine, z.B. Enzyme, im Analyt spezifisch zu binden.

Der elektrische Parameter, der gemäß dem aus [1] bekannten Verfahren ausgewertet wird, ist die Kapazität zwischen den Elektroden bzw. die Impedanz der beiden Elektroden.

Um eine möglichst große Sensitivität bei der Erfassung von makromolekularen Biopolymeren zu erreichen ist es wünschenswert, eine möglichst große Menge von Feldlinien zwischen den beiden Elektroden in dem Volumen anzuordnen, in dem die Hybridisierung der DNA-Stränge vorgegebener Sequenzen mit den DNA-Sondenmolekülen, allgemein der Bindung makromolekularer Biopolymere an immobilisierte DNA-Sondenmoleküle, erfolgt.

Bei dem bekannten Verfahren wird die Impedanz bzw. die Kapazität in ihrer Veränderung erfasst, wenn nur DNA-Sondenmoleküle vorhanden sind gegenüber dem Fall, dass DNA-Sondenmoleküle mit den zu erfassenden DNA-Strängen hybridisiert sind.

5

Der Erfindung liegt das Problem zugrunde, ein Verfahren zum Erfassen makromolekularer Biopolymere anzugeben, mit dem ein robusteres Messsignal erzielt wird, d.h. eine größere Veränderung in dem Impedanzsignal zwischen dem Zustand, in dem
10 keine Haltemoleküle oder ausschließlich Haltemoleküle auf den Elektroden angebracht sind und dem, dass zumindest teilweise eine Bindung mit den nachzuweisenden makromolekularen Biopolymeren erfolgt ist.

15 Das Problem wird durch das Verfahren mit den Merkmalen gemäß dem unabhängigen Patentanspruch gelöst.

Im Rahmen des Verfahrens wird eine Elektrodenanordnung eingesetzt, die eine erste Elektrode und eine zweite Elektrode
20 aufweist. Die erste Elektrode kann mit ersten Molekülen physisch (d.h. durch Adsorption) oder chemisch (d.h. über kovalente Bindungen) versehen sein, die makromolekulare Biopolymere eines ersten Typs binden können. Die zweite Elektrode kann physisch oder chemisch mit zweiten Molekülen versehen
25 sein, die makromolekulare Biopolymere eines zweiten Typs binden können.

Unter makromolekularen Biopolymeren sind beispielsweise Proteine oder Peptide oder auch DNA-Stränge einer jeweils vorgegebenen Sequenz zu verstehen.
30

Sollen als makromolekulare Biopolymere Proteine oder Peptide erfasst werden, so sind die ersten Moleküle und die zweiten Moleküle Liganden, beispielsweise Wirkstoffe mit einer möglichen Bindungsaktivität, die die zu erfassenden Proteine oder
35 Peptide an die jeweilige Elektrode binden, auf der die entsprechenden Liganden angeordnet sind.

Als Liganden kommen Enzymagonisten oder Enzymantagonisten, Pharmazeutika, Zucker oder Antikörper oder irgendein Molekül in Betracht, das die Fähigkeit besitzt, Proteine oder Peptide
5 spezifisch zu binden.

Im Rahmen dieser Beschreibung ist unter einem Sondenmolekül sowohl ein Ligand als auch ein DNA-Sondenmolekül zu verstehen.
10

Die Elektrodenanordnung kann eine Plattenelektrodenanordnung sein oder eine Interdigitalelektrodenanordnung, wie aus [1] bekannt.

15 Ferner können verschiedene Anordnungen der Parallelschaltung von Elektroden in der Elektrodenanordnung vorgesehen sein, beispielsweise können die Elektroden als zylindrische Elemente ausgestaltet sein, die jeweils konzentrisch umeinander angeordnet sind und elektrisch voneinander beispielsweise mittels
20 eines geeigneten Dielektrikums voneinander isoliert sind, so dass sich ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden ausbildet.

Werden als makromolekulare Biopolymere DNA-Stränge einer vorgegebenen Sequenz verwendet, die mittels der Elektrodenanordnung erfasst werden sollen, so können mittels der Elektrodenanordnung DNA-Stränge einer vorgegebenen ersten Sequenz mit DNA-Sondenmolekülen mit der zu der ersten Sequenz komplementären Sequenz als erste Moleküle auf der ersten Elektrode hybridisiert werden. Zum Erfassen eines DNA-Strangs einer vorgegebenen zweiten Sequenz mittels zweiter Moleküle auf der zweiten Elektrode werden DNA-Sondenmoleküle als zweite Moleküle eingesetzt, die eine Sequenz aufweisen, die komplementär ist zu der zweiten Sequenz des DNA-Strangs.
30

35

In einem ersten Verfahrensschritt wird eine erste elektrische Messung an den Elektroden durchgeführt, wobei bei der ersten

elektrischen Messung die ersten Moleküle und/oder die zweiten Moleküle schon auf den Elektroden angeordnet sein können oder auch nicht.

- 5 Ein Medium, beispielsweise ein Elektrolyt, wird mit den Elektroden in Kontakt gebracht. Dies erfolgt in der Weise, dass für den Fall, dass sich in dem Medium makromolekulare Biopolymere des ersten Typs befinden, sich diese an die ersten Moleküle binden können. Für den Fall, dass sich in dem Medium
10 makromolekulare Biopolymere des zweiten Typs befinden, können sich diese an die zweiten Moleküle binden.

- Es ist anzumerken, dass die makromolekularen Biopolymere des ersten Typs nur an die ersten Moleküle auf der ersten Elektrode binden und dass die makromolekularen Biopolymere des
15 zweiten Typs nur an die zweiten Moleküle auf der zweiten Elektrode binden

- Nachdem eine ausreichende Zeitdauer gewartet worden ist, so
20 dass sich die makromolekularen Biopolymere an die ersten Moleküle bzw. an die zweiten Moleküle binden konnten, werden nicht gebundene erste Moleküle oder zweite Moleküle von der jeweiligen Elektrode, auf der sie sich befinden, entfernt.

- 25 Für den Fall, dass die Sondenmoleküle DNA-Stränge sind, erfolgt dies beispielsweise enzymatisch mittels eines Enzyms, das selektiv einzelsträngige DNA abbaut. Hierbei ist die Selektivität des abbauenden Enzyms für einzelsträngige DNA zu berücksichtigen. Besitzt das für den Abbau nicht-hybridisier-
30 ter DNA-Einzelstränge ausgewählte Enzym diese Selektivität nicht, so wird möglicherweise auch die zu erfassende, hybridisierte doppelsträngige DNA unerwünscht mit abgebaut.

- Insbesondere können zum Entfernen der nicht gebundenen ersten
35 oder zweiten DNA-Sondenmoleküle von der jeweiligen Elektrode DNA Nukleasen, beispielsweise eine Nuklease aus Mung-Bohnen, die Nuklease P1 oder die Nuklease S1 verwendet werden. Die

Verwendung von DNA-Polymerasen, die aufgrund ihrer $5' \rightarrow 3'$ oder ihrer $3' \rightarrow 5'$ Exonukleaseaktivität imstande sind, einzelsträngige DNA abzubauen, können ebenfalls verwendet werden.

5

Für den Fall, dass die Sondenmoleküle niedermolekulare Liganden sind, lassen sich diese, falls ungebunden, auch enzymatisch entfernen.

10 Hierzu sind die Liganden über eine enzymatisch spaltbare Verbindung kovalent mit der Elektrode verbunden, beispielsweise über eine Esterverbindung.

In diesem Falle kann beispielsweise eine Carboxylester-
15 Hydrolase (Esterase) eingesetzt werden, um ungebundene Ligandenmoleküle zu entfernen. Dieses Enzym hydrolysiert diejenige Esterverbindung zwischen der Elektrode und dem jeweiligen Ligandenmolekül, das nicht von einem Peptid oder Protein gebunden wurde. Dahingegen bleiben die Esterverbindungen zwischen
20 der Elektrode und denjenigen Molekülen, die eine Bindungswechselwirkung mit Peptiden oder Proteinen eingegangen sind, aufgrund der verminderten sterischen Zugänglichkeit, die durch die molekulare Masse des gebundenen Peptids oder Proteins eintritt, unversehrt.

25

Nach erfolgtem Entfernen der nicht gebundenen ersten Moleküle oder zweiten Moleküle wird eine zweite elektrische Messung an den Elektroden durchgeführt.

30 Die ermittelten Werte aus der ersten elektrischen Messung und der zweiten elektrischen Messung werden miteinander verglichen, und wenn die Kapazitätswerte sich in einer Weise unterscheiden, dass die Differenz der ermittelten Werte größer ist als ein vorgegebener Schwellenwert, so wird angenommen, dass
35 sich makromolekulare Biopolymere mit Sondenmolekülen bzw. allgemein mit den ersten oder zweiten Molekülen, gebunden ha-

ben, wodurch die Veränderung des elektrischen Signals an den Elektroden verursacht worden ist.

Ist die Differenz zwischen den Werten der ersten elektrischen
5 Messung und der zweiten elektrischen Messung größer als der
vorgegebene Schwellenwert, so wird als Ergebnis ausgegeben,
dass die entsprechenden, die ersten Moleküle bzw. zweiten Mo-
leküle spezifisch bindenden makromolekularen Biopolymere ge-
bunden worden sind und somit, dass die entsprechenden makro-
10 molekularen Biopolymere in dem Medium enthalten waren.

Auf diese Weise sind die makromolekularen Biopolymere erfasst
worden.

15 Die erste elektrische Messung und die zweite elektrische Mes-
sung können realisiert werden, indem die Kapazität zwischen
den Elektroden gemessen wird.

Alternativ können auch der elektrische Widerstand der einzel-
20 nen Elektroden ermittelt werden.

Allgemein kann als erste elektrische Messung und als zweite
elektrische Messung eine Impedanzmessung durchgeführt werden,
in dessen Rahmen sowohl die Kapazität zwischen den Elektroden
25 als auch die elektrischen Widerstände gemessen werden.

Anschaulich kann die Erfindung darin gesehen werden, dass
durch Entfernen nicht gebundener erster Moleküle oder zweiter
Moleküle von der jeweiligen Elektrode der Unterschied zwi-
30 schen den ermittelten Werten der elektrischen Signale zwi-
schen der ersten elektrischen Messung und der zweiten elek-
trischen Messung beim Binden von makromolekularen Biopolyme-
ren dadurch weiter vergrößert wird, dass die nicht gebundenen
Moleküle, die das Messergebnis verfälschen, keinen störenden
35 Einfluss mehr auf das Messergebnis haben.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in den Figuren dargestellt und wird im weiteren näher erläutert.

Es zeigen

5

Figuren 1a bis 1c eine Elektrodenanordnung zu unterschiedlichen Verfahrenszuständen, anhand denen das Verfahren gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung erläutert wird;

10

Figuren 2a und 2b eine Skizze zweier Planarelektroden, mittels derer die Existenz zu erfassender DNA-Stränge in einem Elektrolyt (Figur 2a) bzw. deren Nicht-Existenz (Figur 2b) nachgewiesen werden können;

15

Figur 3 Interdigitalelektroden gemäß dem Stand der Technik;

Figur 4 eine Skizze einer Elektrodenanordnung, die im Rahmen eines zweiten Ausführungsbeispiels eingesetzt wird.

20

Figur 5 einen Biosensor gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung;

25

Figur 6 einen Querschnitt eines Biosensors mit zwei Elektroden, die als Interdigitalelektrodenanordnung angeordnet sind;

30

Figuren 7a bis 7d Querschnittsansichten einer Interdigitalelektrode in vier Verfahrenszuständen in einem Herstellungsverfahren eines Biosensors gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung;

35

Figuren 8a bis 8c Querschnittsansichten eines Biosensors während einzelner Verfahrensschritte des Herstellungsverfahrens einer Elektrode des Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;

10

Figuren 9a bis 9c Querschnittsansichten eines Biosensors während einzelner Verfahrensschritte des Herstellungsverfahrens einer Elektrode des Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;

5

Figuren 10a bis 10c jeweils einen Querschnitt eines Biosensors zu verschiedenen Zeitpunkten während des Herstellungsverfahrens gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;

10

Figur 11 eine Draufsicht eines Biosensor-Arrays gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung mit zylinderförmigen Elektroden;

15

Figur 12 eine Draufsicht eines Biosensor-Arrays gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung mit quaderförmigen Elektroden;

20

Figur 13 eine Querschnittsansicht eines Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;

Figur 14 eine Querschnittsansicht eines Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung; und

25

Figuren 15a bis 15g Querschnittsansichten eines Biosensors während einzelner Verfahrensschritte eines Herstellungsverfahrens gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;

30

Fig.1a zeigt eine Elektrodenanordnung 100 mit einer ersten Elektrode 101 und einer zweiten Elektrode 102, die in einer Isolatorschicht 103 aus Isolatormaterial angeordnet sind.

35

Die erste Elektrode 101 ist mit einem ersten elektrischen Anschluss 104 versehen und die zweite Elektrode 102 ist mit einem zweiten elektrischen Anschluss 105 versehen.

Die erste Elektrode 101 und die zweite Elektrode 102 sind aus Gold hergestellt.

Alternativ können die Elektroden 101 und 102 auch aus Siliziumoxid hergestellt sein. Diese können mit einem Material beschichtet werden, das geeignet ist, die Sondenmoleküle darauf zu immobilisieren.

Beispielsweise können bekannte Alkoxysilanderivate verwendet werden wie

- 3-Glycidoxypropylmethoxysilan,
 - 3-Acetoxypropyltrimethoxysilan,
 - 3-Aminopropyltriethoxysilan,
 - 4-(Hydroxybutyramido)propyltriethoxysilan,
 - 3-N,N-bis(2-hydroxyethyl)aminopropyltriethoxysilan,
- oder andere artverwandte Materialien, die imstande sind, mit ihrem einen Ende eine kovalente Bindung mit der Oberfläche des Siliziumoxids einzugehen und mit ihrem anderen Ende dem zu immobilisierenden Sondenmolekül eine chemisch reaktive Gruppe wie einen Epoxy-, Acetoxy-, Amin- oder Hydroxylrest zur Reaktion anzubieten.

Reagiert ein zu immobilisierendes Sondenmolekül mit einer solchen aktivierten Gruppe, so wird es über das gewählte Material als eine Art kovalenter Linker auf der Oberfläche der Beschichtung auf der Elektrode immobilisiert.

Auf den immobilisierten Bereichen der Elektroden 101, 102 sind DNA-Sondenmoleküle 106, 107 aufgebracht.

30

Auf der ersten Elektrode 101 sind erste DNA-Sondenmoleküle 106 mit einer zu einer vorgegebenen ersten DNA-Sequenz komplementären Sequenz aufgebracht.

35 Auf der zweiten Elektrode 102 sind zweite DNA-Sondenmoleküle 107 mit einer Sequenz, die komplementär ist zu einer vorgegebenen zweiten DNA-Sequenz ist, aufgebracht.

An die Pyrimidinbasen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T), oder Cytosin (C), können jeweils zu den Sequenzen der Sondenmoleküle komplementäre Sequenzen von DNA-Strängen in der üblichen Weise, d.h. Basenpaarung über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen A und T bzw. zwischen C und G, hybridisieren.

Fig.1a zeigt ferner ein Elektrolyt 108, das mit den Elektroden 101, 102 und den DNA-Sondenmolekülen 106, 107 in Kontakt gebracht wird.

Fig.1b zeigt die Elektrodenanordnung 100 für den Fall, dass in dem Elektrolyt 108 DNA-Stränge 109 mit der vorgegebenen ersten Sequenz enthalten sind, die komplementär ist zu der Sequenz der ersten DNA-Sondenmoleküle 106.

In diesem Fall hybridisieren die zu den ersten DNA-Sondenmolekülen komplementären DNA-Stränge 109 mit den ersten DNA-Sondenmolekülen 106, die auf der ersten Elektrode 101 aufgebracht sind.

Da die Sequenzen von DNA-Strängen nur mit der jeweils spezifischen Komplementärsequenz hybridisieren, hybridisieren die zu den ersten DNA-Sondenmolekülen komplementären DNA-Stränge nicht mit den zweiten DNA-Sondenmolekülen 107.

Wie aus Fig.1b ersichtlich ist, ist das Resultat nach erfolgreicher Hybridisierung, dass auf der ersten Elektrode 101 hybridisierte Moleküle aufgebracht sind, d.h. doppelsträngige DNA-Moleküle. Auf der ersten Elektrode sind nur die zweiten DNA-Sondenmoleküle 107 als weiterhin einsträngige Moleküle vorhanden.

In einem weiteren Schritt wird mittels eines biochemischen Verfahrens beispielsweise mittels DNA-Nukleasen zu dem Elektrolyt 108 ein Hydrolysieren der Einzelstrang-DNA-Sondenmoleküle 107 der zweiten Elektrode 102 bewirkt.

Hierbei ist die Selektivität des abbauenden Enzyms für einzelsträngige DNA zu berücksichtigen. Besitzt das für den Abbau nicht-hybridisierter DNA-Einzelstränge ausgewählte Enzym diese Selektivität nicht, so wird möglicherweise auch die zu erfassende, hybridisierte doppelsträngige DNA unerwünscht mit abgebaut, was zu einer Verfälschung des Messergebnisses führen würde.

- 10 Nach Entfernen der Einzelstrang-DNA-Sondenmoleküle, d.h. der zweiten DNA-Sondenmoleküle 107 auf der zweiten Elektrode 102 sind lediglich die Doppelstrang-Moleküle der hybridisierten DNA-Stränge mit der zu der ersten Sequenz der ersten DNA-Sondenmoleküle 106 komplementären Sequenz vorhanden (vgl. Fig.1c).

Beispielsweise kann zum Entfernen der Einzelstrang-DNA-Sondenmoleküle 107 auf der zweiten Elektrode einer der folgenden Stoffe beigegeben werden:

- 20 • Nuklease aus Mung-Bohnen,
• Nuklease P1, oder
• Nuklease S1.

- 25 Die Verwendung von DNA-Polymerasen, die aufgrund ihrer 5' → 3' Exonukleaseaktivität oder ihrer 3' → 5' Exonukleaseaktivität imstande sind, einzelsträngige DNA abzubauen, können zu diesem Zweck ebenfalls verwendet werden.

- 30 Wird dem Elektrolyt eine Probesubstanz versetzt, die DNA-Stränge mit enthält, die zu der Sequenz der zweiten DNA-Sondenmoleküle 107 auf der zweiten Elektrode 102 komplementär ist, so erfolgt eine Hybridisierung der versetzten DNA-Stränge der zu den zweiten DNA-Sondenmolekülen 107 komplementären Sequenz mit den zweiten DNA-Sondenmolekülen 107 und es
35 verbleiben die ersten DNA-Sondenmoleküle 106 als Einzelstrang-Sondenmoleküle auf der ersten Elektrode.

Diese werden gemäß dem in Fig.1b dargestellten Verfahren in analoger Weise von der ersten Elektrode 101 mittels der oben dargestellten biochemischen Verfahren entfernt.

- 5 Mittels eines an die Elektrodenanschlüsse 104, 105 angeschlossenen Messgeräts (nicht dargestellt) erfolgt gemäß diesem ersten Ausführungsbeispiel eine Kapazitätsmessung zwischen den Elektroden 101, 102 in dem in Fig.1a dargestellten Zustand, d.h. in nicht-hybridisiertem Zustand.

10

Im Rahmen der ersten Kapazitätsmessung wird ein Referenz-Kapazitätswert ermittelt und in einem Speicher (nicht dargestellt) gespeichert.

- 15 Eine zweite Kapazitätsmessung erfolgt, nachdem die einsträngigen DNA-Sondenmoleküle 107 von der jeweiligen Elektrode entfernt worden sind.

20 Dies erfolgt wiederum mittels des nicht dargestellten Messgeräts. Mittels der zweiten Kapazitätsmessung wird ein Kapazitätswert ermittelt, der mit dem Referenz-Kapazitätswert verglichen wird.

25 Ist der Differenzwert zwischen diesen Kapazitätswerten größer als ein vorgegebener Schwellenwert, so bedeutet dies, dass in dem Elektrolyt 108 DNA-Stränge enthalten waren, die entweder mit den ersten DNA-Sondenmolekülen oder mit den zweiten DNA-Sondenmolekülen hybridisiert sind.

- 30 In diesem Fall wird ein entsprechendes Ausgangssignal von dem Messgerät dem Benutzer des Messgeräts ausgegeben.

Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass je nach verwendetem Stoff zum Entfernen der Einzelstrang-DNA-Sondenmoleküle 107 auf der zweiten Elektrode der einzelsträngige Anteil der hybridisierten DNA-Stränge 109 erhalten bleiben kann oder auch mit entfernt werden kann.

35

Fig.4 zeigt eine Sensoranordnung 400, bei der an Stelle der Kapazitätsmessung in einem zweiten Ausführungsbeispiel eine Impedanzmessung durchgeführt wird.

5

Die in Fig.4 dargestellte Sensoranordnung 400 ist in dem Zustand dargestellt, dass eine Hybridisierung der zu den ersten DNA-Sondenmolekülen 106 komplementären DNA-Stränge mit den ersten DNA-Sondenmoleküle 106 schon erfolgt ist und nachdem
10 die zweiten DNA-Sondenmoleküle 107, die nicht hybridisiert sind, von der zweiten Elektrode 102 entfernt worden sind.

Für jede Elektrode 101, 102 ist jeweils eine Referenzelektrode 401, 402 vorgesehen, die derart eingerichtet sind, dass
15 die DNA-Sondenmoleküle 106, 107 nicht an diesen Referenzelektroden 401, 402 haften.

Dies kann dadurch gewährleistet werden, dass ein Material für die Referenzelektroden 401, 402 gewählt wird, das keine
20 Schwefelbindung ermöglicht.

Alternativ kann eine unerwünschte Haftung der DNA-Sondenmoleküle auf der Referenzelektrode dadurch verhindert werden, dass das zur Immobilisierung der DNA-Sondenmoleküle geeignete
25 Beschichtungsmaterial (s. oben) im Voraus nicht auf die Referenzelektrode aufgebracht wird. Somit entstehen keine chemisch reaktive Gruppen auf der Referenzelektrode, die sonst eine kovalente Bindung mit den DNA-Sondenmolekülen eingehen, und somit diese dort immobilisieren würden.

30

Alternativ kann dies durch Anlegen eines ausreichend großen negativen elektrischen Feldes gewährleistet werden, wodurch sichergestellt wird, dass die negativ geladenen DNA-Sondenmoleküle 106, 107 nicht an den Referenzelektroden 401, 402
35 haften.

Jede Referenzelektrode 401, 402 ist mit einem elektrischen Referenzanschluss 403, 404 gekoppelt.

Im Rahmen des zweiten Ausführungsbeispiels erfolgt eine erste
5 Impedanzmessung in dem unbelegten Zustand, d.h. beispielsweise in einem Zustand ohne Sondenmoleküle 106, 107 auf den Elektroden 101, 102 oder mit nicht hybridisierten DNA-Sondenmolekülen 106, 107.

10 Nach erfolgtem Entfernen der einsträngigen DNA-Sondenmoleküle nach eventueller Hybridisierung der passenden DNA-Sondenmoleküle 106, 107 mit einem DNA-Strang der vorgegebenen, zu dem jeweiligen DNA-Sondenmolekül 106, 107 komplementären Sequenz
15 führt und aufgrund der sich möglicherweise veränderten Impedanzwerte wird ermittelt, ob eine Hybridisierung von Sondenmolekülen 106, 107 und DNA-Strängen 109 mit jeweils komplementärer Sequenz stattgefunden hat oder nicht.

20 Die Erfindung ist nicht auf eine Elektrodenanordnung mit lediglich zwei Elektroden eingeschränkt, insbesondere nicht auf die gemäß dem Ausführungsbeispiel erläuterte Plattenelektrodenanordnung.

25 Es ist ohne Änderung des Verfahrens möglich, dieses im Rahmen einer Interdigitalelektrodenanordnung durchzuführen oder auch mit einer beliebigen Anzahl unterschiedlicher Elektroden, an denen unterschiedliche DNA-Sondenmoleküle mit unterschiedlichen Sequenzen aufgebracht sind, wodurch es möglich ist, eine
30 Vielzahl unterschiedlicher DNA-Stränge mit unterschiedlichen Sequenzen arrayartig zu erfassen.

Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die Erfindung nicht auf die Anwendung bei einer Planarelektrodenanordnung be-
35 schränkt ist.

Vielmehr kann die Erfindung auch bei einer Elektrodenanordnung eingesetzt werden, bei der die erste Elektrode und die zweite Elektrode derart relativ zueinander angeordnet sind, dass sich zwischen dem ersten Haltebereich und dem zweiten Haltebereich im wesentlichen ungekrümmte Feldlinien eines
5 zwischen der ersten Elektrode und der zweiten Elektrode erzeugten elektrischen Feldes ausbilden können.

Im weiteren werden einige solcher Elektrodenanordnungen und
10 Verfahren zu deren Herstellung näher erläutert.

Fig.5 zeigt einen Biosensorchip 500 mit einer weiteren Elektrodenkonfiguration.

15 Der Biosensorchip 500 weist eine erste Elektrode 501 und eine zweite Elektrode 502 auf, die auf einer Isolatorschicht 503 derart angeordnet sind, dass die erste Elektrode 501 und die zweite Elektrode 502 voneinander elektrisch isoliert sind.

20 Die erste Elektrode 501 ist mit einem ersten elektrischen Anschluss 504 gekoppelt, und die zweite Elektrode 502 ist mit einem zweiten elektrischen Anschluss 505 gekoppelt.

Die Elektroden 501, 502 weisen eine quaderförmige Struktur
25 auf, wobei sich eine erste Elektrodenfläche 506 der ersten Elektrode 501 und eine erste Elektrodenfläche 507 der zweiten Elektrode 502 im wesentlichen parallel zueinander ausgerichtet gegenüberstehen.

30 Dies wird dadurch erreicht, dass gemäß diesem Ausführungsbeispiel die Elektroden 501, 502 im wesentlichen bezüglich der Oberfläche 508 der Isolatorschicht 503 senkrechte Seitenwände 506, 507 aufweisen, welche die erste Elektrodenfläche 506 der ersten Elektrode 501 bzw. die erste Elektrodenfläche 507 der
35 zweiten Elektrode 502 bilden.

Wird ein elektrisches Feld zwischen der ersten Elektrode 501 und der zweiten Elektrode 502 angelegt, so wird durch die sich im wesentlichen parallel zueinander ausgerichteten Elektrodenflächen 506, 507 ein Feldlinienverlauf mit Feldlinien 509 erzeugt, die zwischen den Oberflächen 506, 507 im wesentlichen ungekrümmt sind.

Gekrümmte Feldlinien 510 ergeben sich lediglich zwischen einer zweiten Elektrodenfläche 511 der ersten Elektrode 501 und einer zweiten Elektrodenfläche 512 der zweiten Elektrode 502, die jeweils für die Elektroden 501, 502 die oberen Oberflächen bilden, sowie in einem Randbereich 513 zwischen den Elektroden 501, 502.

Die ersten Elektrodenflächen 506, 507 der Elektroden 501, 502 sind als Haltebereiche zum Halten von Sondenmolekülen, die makromolekulare Biopolymere, die mittels des Biosensors 500 zu erfassen sind, binden können.

Die Elektroden 501, 502 sind gemäß diesem Ausführungsbeispiel aus Gold hergestellt.

Es werden kovalente Verbindungen zwischen den Elektroden und den Sondenmolekülen hergestellt, wobei der Schwefel zum Bilden einer Gold-Schwefel-Kopplung in Form eines Sulfids oder eines Thiols vorhanden ist.

Für den Fall, dass als Sondenmoleküle DNA-Sondenmoleküle verwendet werden, sind solche Schwweifunktionalitäten Teil eines modifizierten Nukleotids, das mittels der Phosphoramiditchemie während eines automatisierten DNA-Syntheseverfahrens am 3'-Ende oder am 5'-Ende des zu immobilisierenden DNA-Strangs eingebaut wird. Das DNA-Sondenmolekül wird somit an seinem 3'-Ende oder an seinem 5'-Ende immobilisiert.

Für den Fall, dass als Sondenmoleküle Liganden verwendet werden, werden die Schwweifunktionalitäten durch ein Ende eines

Alkyl-linkers oder eines Alkyl-linkers gebildet, dessen anderes Ende eine für die kovalente Verbindung des Liganden geeignete chemische Funktionalität aufweist, beispielsweise einen Hydroxylrest, einen Acetoxyrest oder einen Succinimidylesterrest.

Die Elektroden, d.h. insbesondere die Haltebereiche werden beim Messeinsatz mit einem Elektrolyt 514, allgemein mit einer zu untersuchenden Lösung, bedeckt.

10

Befinden sich in der zu untersuchenden Lösung 514 die zu erfassenden makromolekularen Biopolymere, beispielsweise zu erfassende DNA-Stränge mit einer vorgegebenen Sequenz, die mit den immobilisierten DNA-Sondenmolekülen auf den Elektroden hybridisieren können, so hybridisieren die DNA-Stränge mit den DNA-Sondenmolekülen.

15

Sind in der zu untersuchenden Lösung 514 keine DNA-Stränge mit der zu der Sequenz der DNA-Sondenmolekülen komplementären Sequenz enthalten, so können keine DNA-Strängen aus der zu untersuchenden Lösung 514 mit den DNA-Sondenmolekülen auf den Elektroden 501, 502 hybridisieren.

20

Fig.6 zeigt einen Biosensor 600 mit einer weiteren Elektrodenkonfiguration gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung.

25

Bei dem Biosensor 600 sind in gleicher Weise wie bei dem Biosensor 500 gemäß dem in Fig.5 gezeigten Ausführungsbeispiel zwei Elektroden 501, 502 vorgesehen, die auf der Isolatorschicht 503 aufgebracht sind.

30

Im Unterschied zu dem Biosensor 500 mit lediglich zwei quaderförmigen Elektroden sind die zwei Elektroden gemäß dem in Fig.6 dargestellten Biosensor 600 als eine Vielzahl von jeweils abwechselnd angeordneten, parallel geschalteten Elek-

35

troden in Form der bekannten Interdigitalelektrodenanordnung angeordnet.

Fig.6 zeigt zur weiteren Veranschaulichung ferner ein schematisches elektrisches Ersatzschaltbild, das in die Darstellung des Biosensors 600 eingezeichnet ist.

Da sich zwischen den im wesentlichen sich parallel gegenüberstehenden Elektrodenflächen 506, 507 der Elektroden 501, 502, wie in Fig.7 dargestellt wurde, im wesentlichen ungekrümmte Feldlinien bezüglich der Oberfläche 508 der Isolatorschicht 503 ergeben, überwiegt der Anteil der durch die ungekrümmten Feldlinien erzeugten ersten Kapazität 602 und des ersten Leitwerts 603 verglichen mit der zweiten Kapazität 604 und des zweiten Leitwerts 605, die durch die gekrümmten Feldlinien 510 erzeugt werden.

Dieser erheblich größerer Anteil der ersten Kapazität 602 und des ersten Leitwerts 603 an dem Gesamtleitwert, der sich aus der Summe der ersten Kapazität 602 und der zweiten Kapazität 604 sowie des ersten Leitwerts 603 und des zweiten Leitwerts 605 ergeben, führt dazu, dass die Sensitivität des Biosensors 600 bei Änderung des Zustandes des Biosensors 600, d.h. bei Hybridisierung von DNA-Strängen in der zu untersuchenden Lösung 514 mit auf den Haltebereichen auf den Elektrodenflächen 506, 507 immobilisierten DNA-Sondenmolekülen 601 erheblich erhöht wird.

Somit ist anschaulich bei gleichen lateralen Abmessungen der Elektroden 501, 502 und bei gleichen Abmessungen des zuvor eingeführten aktiven Bereichs, d.h. bei gleicher Fläche der Haltebereiche auf den Elektrodenflächen ein wesentlich größerer Anteil von Feldlinien eines angelegten elektrischen Feldes zwischen den Elektroden 501, 502 in dem Volumen enthalten, in dem die Hybridisierung stattfindet, wenn die zu erfassenden DNA-Stränge in der zu untersuchenden Lösung 514 enthalten sind als bei einer Planarelektrodenanordnung.

In anderen Worten bedeutet dies, dass die Kapazität der erfindungsgemäßen Anordnung pro Chipfläche deutlich größer ist als die Kapazität pro Chipfläche bei einer Planarelektrodenanordnung.

Im weiteren werden einige Alternativenmöglichkeiten zur Herstellung einer quaderförmigen Sensorelektrode mit im wesentlichen senkrechten Seitenwänden erläutert.

Erstes Verfahren zum Herstellen von Metallelektroden mit im wesentlichen senkrechten Seitenwänden, die Sondenmoleküle immobilisieren können

Fig.7a zeigt ein Siliziumsubstrat 700, wie es für bekannte CMOS-Prozesse hergestellt wird.

Auf dem Siliziumsubstrat 700, in dem sich bereits integrierte Schaltungen und/oder elektrische Anschlüsse für die zu bildenden Elektroden befinden, wird eine Isolatorschicht 701, die auch als Passivierungsschicht dient, in ausreichender Dicke, gemäß dem Ausführungsbeispiel in einer Dicke von 500 nm, mittels eines CVD-Verfahrens aufgebracht.

Die Isolatorschicht 701 kann aus Siliziumoxid SiO_2 oder Siliziumnitrid Si_3N_4 hergestellt sein.

Die Interdigitalanordnung des Biosensors 600 gemäß dem oben dargestellten Ausführungsbeispiel wird mittels Photolithographie auf der Isolatorschicht 701 definiert.

Anschließend werden mittels eines Trockenätzverfahrens, z.B. dem Reactive Ion Etching (RIE), in der Isolatorschicht 701 Stufen 702 erzeugt, d.h. geätzt, gemäß dem Ausführungsbeispiel in einer Mindesthöhe 703 von ungefähr 100 nm.

Die Höhe 703 der Stufen 702 muss ausreichend groß sein für einen anschließenden selbstjustierenden Prozess zum Bilden der Metallelektrode.

- 5 Es ist darauf hinzuweisen, dass zum Auftragen der Isolatorschicht 701 alternativ auch ein Aufdampfverfahren oder ein Sputterverfahren eingesetzt werden kann.

- 10 Bei der Strukturierung der Stufen 702 ist zu beachten, dass die Flanken der Stufen 702 ausreichend steil sind, so dass sie hinreichend scharfe Kanten 705 bilden. Ein Winkel 706 der Stufenflanken gemessen zur Oberfläche der Isolatorschicht 701 sollte gemäß dem Ausführungsbeispiel mindestens 50° betragen.

- 15 In einem weiteren Schritt wird eine Hilfsschicht 704 (vgl. Fig.7b) der Dicke von ungefähr 10 nm aus Titan auf die stufenförmige Isolatorschicht 701 aufgebracht.

- 20 Die Hilfsschicht 704 kann Wolfram, und/oder Nickel-Chrom, und/oder Molybdän aufweisen.

- 25 Es ist zu gewährleisten, dass die in einem weiteren Schritt aufgetragene Metallschicht, gemäß dem Ausführungsbeispiel eine Metallschicht 707 aus Gold, an den Kanten 705 der Stufen 702 derart porös aufwächst, dass es möglich ist, in einem weiteren Verfahrensschritt an den Stufenübergängen jeweils eine Spalte 708 in die ganzflächig aufgetragene Goldschicht 707 zu ätzen.

- 30 In einem weiteren Verfahrensschritt wird die Goldschicht 707 für den Biosensor 600 aufgebracht.

Gemäß dem Ausführungsbeispiel weist die Goldschicht 707 eine Dicke von ungefähr 500 nm bis ungefähr 2000 nm auf.

- 35 Es ist hinsichtlich der Dicke der Goldschicht 707 lediglich zu gewährleisten, dass die Dicke der Goldschicht 707 ausrei-

chend ist, so dass die Goldschicht 707 porös kolumnar aufwächst.

5 In einem weiteren Schritt werden Öffnungen 708 in die Goldschicht 707 geätzt, so dass sich Spalten ausbilden (vgl. Fig.7c).

10 Zum Nassätzen der Öffnungen wird eine Ätzlösung aus 7,5 g Super Strip 100TM (Markenname der Firma Lea Ronal GmbH, Deutschland) und 20 g KCN in 1000 ml Wasser H₂O verwendet.

15 Durch das kolumnare Wachstum des Goldes, allgemein des Metalls, während des Aufdampfens auf die Haftschrift 704 wird ein anisotroper Ätzangriff erzielt, so dass der Oberflächenabtrag des Goldes ungefähr im Verhältnis 1:3 erfolgt.

Durch das Ätzen der Goldschicht 707 werden die Spalten 708 abhängig von der Zeitdauer des Ätzvorgangs gebildet.

20 Dies bedeutet, dass die Zeitdauer des Ätzprozesses die Basisbreite, d.h. den Abstand 709 zwischen den sich ausbildenden Goldelektroden 710, 711 bestimmt.

25 Nachdem die Metallelektroden eine ausreichende Breite aufweisen und der Abstand 709 zwischen den sich bildenden Goldelektroden 710, 711 erreicht sind, wird das Nassätzen beendet (vgl. Fig.7d).

30 Es ist anzumerken, dass aufgrund des porösen Aufdampfens das Ätzen in zu der Oberfläche der Isolatorschicht 701 parallelen Richtung wesentlich schneller erfolgt als in zu der Oberfläche der Isolatorschicht 701 senkrechten Richtung.

35 Es ist darauf hinzuweisen, dass alternativ zu einer Goldschicht auch andere Edelmetalle, wie beispielsweise Platin, Titan oder Silber verwendet werden können, da diese Materialien ebenfalls Haltebereiche aufweisen können bzw. mit einem

geeigneten Material beschichtet werden können zum Halten von immobilisierten DNA-Sondenmolekülen oder allgemein zum Halten von Sondenmolekülen, und ein kolumnares Wachstum beim Aufdampfen aufweisen.

5

Für den Fall, dass die Haftschrift 704 in den geöffneten Spalten 712 zwischen den Metallelektroden 710, 711 entfernt werden soll, erfolgt dies ebenfalls selbstjustierend, indem man die Goldelektroden 710, 711 als Ätzmaske verwendet.

10

Gegenüber den bekannten Interdigitalelektroden weist die Struktur gemäß diesem Ausführungsbeispiel insbesondere den Vorteil auf, dass durch das selbstjustierende Öffnen der Goldschicht 707 über den Kanten 705 der Abstand zwischen den Elektroden 710, 711 nicht an eine minimale Auflösung des Herstellungsprozesses gebunden ist, d.h. der Abstand 709 zwischen den Elektroden 710, 711 kann sehr schmal gehalten werden.

15 Somit ergibt sich gemäß diesem Verfahren der Biosensor 600 gemäß dem in Fig.6 dargestellten Ausführungsbeispiel mit den entsprechenden Metallelektroden.

20

25 Zweites Verfahren zur Herstellung von Metallelektroden mit im wesentlichen senkrechten Seitenwänden, die Sondenmoleküle immobilisieren können

Bei dem in den Fig.8a bis Fig.8c dargestellten Herstellungsverfahren wird von einem Substrat 801 ausgegangen, beispielsweise von einem Silizium-Substrat-Wafer (vgl. Fig.8a), auf dem bereits eine Metallisierung 802 als elektrischer Anschluss vorgesehen ist, wobei auf dem Substrat 801 schon eine Ätzstoppschicht 803 aus Siliziumnitrid Si_3N_4 aufgebracht ist.

35

Auf dem Substrat wird eine Metallschicht 804, gemäß dem Ausführungsbeispiel eine Goldschicht 804 aufgebracht mittels eines Aufdampfverfahrens.

- 5 Alternativ kann ein Sputterverfahren oder ein CVD-Verfahren zum Aufbringen der Goldschicht 804 auf die Ätzstoppschicht 803 eingesetzt werden.

Allgemein weist die Metallschicht 804 das Metall auf, aus dem
10 die zu bildende Elektrode gebildet werden soll.

Auf der Goldschicht 804 wird eine elektrisch isolierende Hilfsschicht 805 aus Siliziumoxid SiO_2 mittels eines CVD-Verfahrens (alternativ mittels eines Aufdampfverfahrens oder
15 eines Sputterverfahrens) aufgebracht.

Durch Einsatz der Photolithographie-Technologie wird eine Lackstruktur aus einer Lackschicht 806 gebildet, beispielsweise eine quaderförmige Struktur, welche Lackstruktur der
20 Form der zu bildenden Elektrode entspricht.

Soll ein im weiteren beschriebenes Biosensor-Array mit einer Vielzahl von Elektroden erzeugt werden, wird mittels der Photolithographie eine Lackstruktur erzeugt, die in ihrer Form
25 der zu bildenden Elektroden entsprechen, die das Biosensor-Array bilden.

In anderen Worten ausgedrückt bedeutet dies, dass die lateralen Abmessungen der gebildeten Lackstruktur den Abmessungen
30 der zu erzeugenden Sensorelektrode entsprechen.

Die Dicke der Lackstruktur, d.h. die Dicke der Lackschicht 806 entspricht im wesentlichen der Höhe der zu erzeugenden Elektroden.

35

Nach Aufbringen der Lackschicht 806 und der entsprechenden Belichtung, die die entsprechenden Lackstrukturen vorgibt,

wird die Lackschicht in den nicht "entwickelten", d.h. nicht belichteten Bereichen beispielsweise mittels Veraschen oder nasschemisch entfernt.

- 5 Auch wird die Hilfsschicht 805 in den nicht durch die Photolackschicht 806 geschützten Bereichen mittels eines Nassätzverfahrens entfernt.

10 In einem weiteren Schritt wird nach Entfernen der Lackschicht 806 über der übrig gebliebenen Hilfsschicht 805 eine weitere Metallschicht 807 als Elektrodenschicht derart konform aufgebracht, dass die Seitenflächen 808, 809 der restlichen Hilfsschicht 805 mit dem Elektrodenmaterial, gemäß dem Ausführungsbeispiel mit Gold, bedeckt sind (vgl. Fig.8b).

15

Das Aufbringen kann mittels eines CVD-Verfahrens oder eines Sputterverfahrens oder mit einem Ion-Metal-Plasma-Verfahren erfolgen.

- 20 In einem letzten Schritt (vgl. Fig.8c) wird eine Spacer-Ätzung durchgeführt, bei der durch gezieltes Überätzen der Metallschichten 804, 807 die gewünschte Struktur der Elektrode 810 gebildet wird.

- 25 Die Elektrode 810 weist somit die nicht in dem Ätzschritt des Ätzens der Metallschichten 804, 807 weggeätzten Spacer 811, 812 auf sowie den unmittelbar unter der restlichen Hilfsschicht 805 angeordneten Teil der ersten Metallschicht 804, der mittels des Ätzverfahrens nicht weggeätzt worden ist.

30

Die Elektrode 810 ist mit dem elektrischen Anschluss, d.h. der Metallisierung 802 elektrisch gekoppelt.

- 35 Die Hilfsschicht 805 aus Siliziumoxid kann bei Bedarf durch eine weitere Ätzung, beispielsweise im Plasma oder nasschemisch, mittels eines Verfahrens entfernt werden, bei dem Selektivität zur Ätzstoppschicht 803 gegeben ist.

Diese ist beispielsweise gewährleistet, wenn die Hilfsschicht 805 aus Siliziumoxid besteht und die Ätzstoppschicht 803 Siliziumnitrid aufweist.

5

Die Steilheit der Wände der Elektrode in dem Biosensorchip 500, 600, repräsentiert durch den Winkel 813 zwischen den Spacer 811, 812 und der Oberfläche 814 der Ätzstoppschicht 803, wird somit durch die Steilheit Flanken der restlichen
10 Hilfsschicht 805, d.h. insbesondere der Steilheit der Lackflanken 815, 816 der strukturierten Lackschicht 806 bestimmt.

Drittes Verfahren zur Herstellung von Metallelektroden mit im
15 wesentlichen senkrechten Seitenwänden, die Sondenmoleküle immobilisieren können

In den Fig.9a bis Fig.9c ist eine weitere Möglichkeit zum Herstellen einer Elektrode mit im wesentlichen senkrechten
20 Wänden dargestellt.

Wiederum wird wie bei dem zweiten Beispiel zum Herstellen einer Elektrode dargestellt, von einem Substrat 901 ausgegangen, auf dem bereits eine Metallisierung 902 für den elektrischen Anschluss der zu bildenden Elektrode des Biosensors
25 vorgesehen ist.

Auf dem Substrat 901 aus Silizium wird eine Metallschicht 903 als Elektrodenschicht aufgedampft, wobei die Metallschicht
30 903 das für die Elektrode zu verwendende Material aufweist, gemäß diesem Ausführungsbeispiel Gold.

Alternativ zu dem Aufdampfen der Metallschicht 903 kann die Metallschicht 903 auch mittels eines Sputterverfahrens oder
35 mittels eines CVD-Verfahrens auf dem Substrat 901 aufgebracht werden.

Auf der Metallschicht 903 wird eine Photolackschicht 904 aufgebracht und mittels Photolithographie-Technologie derart strukturiert, dass eine Lackstruktur entsteht, die nach Entwickeln und Entfernen der entwickelten Bereiche den lateralen Abmessungen der zu bildenden Elektrode bzw. allgemein des zu bildenden Biosensor-Arrays entspricht.

Die Dicke der Photolackschicht 904 entspricht im wesentlichen der Höhe der zu erzeugenden Elektroden.

Bei einer Strukturierung in einem Plasma mit Prozessgasen, die zu keiner Reaktion des Elektrodenmaterials führen können, insbesondere in einem Inertgas-Plasma, beispielsweise mit Argon als Prozessgas, erfolgt der Abtrag des Materials gemäß diesem Ausführungsbeispiel mittels physikalischem Sputter-Abtrag.

Dabei wird das Elektrodenmaterial aus der Metallschicht 903 in einem Redepositionsprozess an die im wesentlichen senkrechten Seitenwände 905, 906 der strukturierten, nach Veraschen der entwickelten Lackstruktur nicht entfernten Lackelemente gesputtert, wo es keinem weiteren Sputterangriff mehr ausgesetzt ist.

Eine Redeposition von Elektrodenmaterial auf die Lackstruktur schützt die Lackstruktur vor weiterem Abtrag.

Aufgrund des Sputterns bilden sich an den Seitenwänden 905, 906 der Lackstruktur Seitenschichten 907, 908 aus dem Elektrodenmaterial, gemäß dem Ausführungsbeispiel aus Gold.

Die Seitenschichten 907, 908 sind elektrisch mit einem nicht entfernten Teil 909 der Metallschicht 903, der sich unmittelbar unterhalb der restlichen Lackstruktur 906 befindet, gekoppelt sowie ferner mit der Metallisierung 903 (vgl. Fig.9b).

In einem letzten Schritt (vgl. Fig.9c) wird die Lackstruktur 906, d.h. der Photolack, der sich in dem durch die Seitenschichten 907, 908 sowie die übrig gebliebene Metallschicht 909 gebildeten Volumen befindet, mittels Veraschen oder naschemisch entfernt.

Ergebnis ist die in Fig.9c dargestellte Elektrodenstruktur 910, die gebildet wird mit den Seitenwänden 907, 908 sowie dem nicht entfernten Teil 909, der den Boden der Elektrodenstruktur bildet und mit der Metallisierung 903 elektrisch gekoppelt ist.

Wie auch im vorangegangenen dargestellten Herstellungsverfahren wird die Steilheit der Seitenwände 907, 908 der gebildeten Elektrode bei diesem Verfahren durch die Steilheit der Lackflanken 905, 906 bestimmt.

In den Fig.10a bis Fig.10c ist ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit zylinderförmigen, auf dem Substrat senkrecht hervortretenden Elektroden dargestellt.

Zur Herstellung des Biosensors 1000 mit zylinderförmigen Elektroden, die im wesentlichen senkrecht auf einem Substrat 1001 aus Siliziumoxid angeordnet sind, wird eine Metallschicht 1002 als Elektrodenschicht aus dem gewünschten Elektrodenmaterial, gemäß dem Ausführungsbeispiel aus Gold, mittels aufgebracht eines Aufdampf-Verfahrens.

Auf der Metallschicht 1002 wird eine Photolackschicht aufgebracht und die Photolackschicht wird mittels einer Maske belichtet derart, dass sich nach Entfernen der nicht belichteten Bereiche die in Fig.10a dargestellte zylinderförmige Struktur 1003 auf der Metallschicht 1002 ergibt.

Die zylinderförmige Struktur 1003 weist einen Photoresist-Torus 1004 sowie ein zylinderförmiger Photoresist-Ring 1005

auf, die konzentrisch um den Photoresist-Torus 1004 angeordnet ist.

5 Zwischen dem Photoresist-Torus 1004 und dem Photoresist-Ring 1005 wird der Photolack entfernt, beispielsweise mittels Veraschens oder nasschemisch.

10 Durch Einsatz eines Sputterverfahrens wird, wie im Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung einer Elektrode, mittels eines Redepositionsprozesses, eine Metallschicht 1006 um den Photolack-Torus 1004 aufgetragen.

In gleicher Weise bildet sich eine innere Metallschicht 1007 um den Photoresist-Ring 1005 (vgl. Fig.10b).

15 In einem weiteren Schritt wird das strukturierte Photolack-Material mittels Veraschen oder nasschemisch entfernt, so dass zwei zylinderförmige Elektroden 1008, 1009 gebildet werden.

20 Das Substrat 1001 wird in einem letzten Schritt so weit entfernt, beispielsweise mittels eines zu dem Elektrodenmaterial selektiven Plasma-Ätzprozesses, dass die Metallisierungen in dem Substrat freigelegt sind und mit den zylinderförmigen
25 Elektroden elektrisch koppeln.

Die innere zylinderförmige Elektrode 1008 ist somit mit einem ersten elektrischen Anschluss 1010 elektrisch gekoppelt und die äußere zylinderförmige Elektrode 1009 ist elektrisch gekoppelt mit einem zweiten elektrischen Anschluss 1011.

30 Die restliche Metallschicht 1002, die durch das Sputtern zwischen den zylinderförmigen Elektroden 1008, 1009 noch nicht entfernt wurde, wird in einem letzten Schritt mittels eines
35 Sputter-Ätzprozesses entfernt. Ebenso wird die Metallschicht 1002 auf diese Weise entfernt.

Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass auch gemäß diesem Ausführungsbeispiel die Metallisierungen für die elektrischen Anschlüsse 1010, 1011 in dem Substrat 1001 zu Beginn des Verfahrens schon vorgesehen sind.

5

Fig.11 zeigt eine Draufsicht eines Biosensor-Arrays 1100, in dem zylinderförmige Elektroden 1101, 1102 enthalten sind.

10

Jede erste Elektrode 1101 weist ein positives elektrisches Potential auf.

15

Jede zweite Elektrode 1102 des Biosensor-Arrays 1100 weist ein bezüglich der jeweiligen benachbarten ersten Elektrode 1101 negatives elektrisches Potential auf.

Die Elektroden 1101, 1102 sind in Zeilen 1103 und Spalten 1104 angeordnet.

20

In jeder Zeile 1103 und in jeder Spalte 1104 sind jeweils die ersten Elektroden 1101 und die zweiten Elektroden 1102 alternierend angeordnet, d.h. jeweils unmittelbar neben einer ersten Elektrode 1101 ist in einer Zeile 1103 oder einer Spalte 1104 eine zweite Elektrode 1102 angeordnet und neben einer zweiten Elektrode 1102 ist jeweils in einer Zeile 1103 oder einer Spalte 1104 eine erste Elektrode 1101 angeordnet.

25

Auf diese Weise ist sichergestellt, dass zwischen den einzelnen Elektroden ein elektrisches Feld erzeugt werden kann mit in Richtung der Höhe der Zylinderelektroden 1101, 1102 im wesentlichen ungekrümmten Feldlinien.

30

Auf den Elektroden ist jeweils, wie oben dargestellt, eine große Anzahl DNA-Sondenmoleküle immobilisiert.

35

Wird nun eine zu untersuchende Lösung (nicht dargestellt) auf das Biosensor-Array 1100 aufgebracht, so hybridisieren

die DNA-Stränge mit den auf den Elektroden immobilisierten, dazu komplementären DNA-Sondenmolekülen.

5 Auf diese Weise kann mittels des oben beschriebenen Redox-Recycling-Vorgangs wiederum die Existenz oder Nicht-Existenz von DNA-Strängen einer vorgegebenen Sequenz in einer zu untersuchenden Lösung mittels des Biosensor-Arrays 1100 erfasst werden.

10 Fig.12 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel eines Biosensor-Arrays 1200 mit einer Vielzahl quaderförmiger Elektroden 1201, 1202.

15 Die Anordnung der quaderförmigen Elektroden 1201, 1202 ist entsprechend der Anordnung der zylinderförmigen Elektroden 1201, 1202, wie sie in Fig.12 dargestellt worden ist und oben erläutert wurde.

20 Fig.13 zeigt eine Elektrodenanordnung eines Biosensorchips 1300 gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung.

Auf der Isolatorschicht 503 ist die erste Elektrode 501 aufgebracht und mit dem ersten elektrischen Anschluss 504 elektrisch gekoppelt.

25 Die zweite Elektrode 502 ist ebenfalls auf der Isolatorschicht 503 aufgebracht und mit dem zweiten elektrischen Anschluss 505 elektrisch gekoppelt.

30 Wie in Fig.13 gezeigt ist, weist die zweite Elektrode 502 gemäß diesem Ausführungsbeispiel gegenüber der vorangegangenen beschriebenen zweite Elektrode eine unterschiedliche Form auf.

35 Die erste Elektrode ist, wie aus Fig.13 ersichtlich, eine Planarelektrode und die zweite Elektrode ist T-förmig ausgestaltet.

Jede T-förmige zweite Elektrode weist einen ersten Schenkel 1301 auf, der im wesentlichen senkrecht zu der Oberfläche 1307 der Isolatorschicht 703 angeordnet.

5 Weiterhin weist die zweite Elektrode 502 senkrecht zu dem ersten Schenkel 1301 angeordnete zweite Schenkel 1302 auf, die zumindest teilweise über der Oberfläche 1303 der jeweiligen ersten Elektrode 501 angeordnet sind.

10 Wie Fig.13 zu entnehmen ist, sind mehrere erste Elektroden 501 und mehrere zweite Elektroden 502 parallelgeschaltet, so dass sich aufgrund der T-förmigen Struktur der zweiten Elektrode 502 ein Hohlraum 1304 ausbildet, der gebildet wird
15 durch zwei neben einander angeordnete zweite Elektroden 502, eine erste Elektrode 501 sowie die Isolatorschicht 503.

Die einzelnen ersten und zweiten Elektroden 501, 502 sind mittels der Isolatorschicht 503 voneinander elektrisch iso-
20 liert.

Zwischen den einzelnen zweiten Schenkeln 1302 der zweiten Elektrode 502 ist für jeden Hohlraum 1304 eine Öffnung 1305 vorgesehen, die ausreichend groß ist, so dass bei Aufbringen
25 eines Elektrolyts 1306 auf den Biosensor 1300 das Elektrolyt und eventuell in der zu untersuchenden Lösung 1306, beispielsweise einem Elektrolyt, enthaltene DNA-Stränge durch die Öffnung 1305 in den Hohlraum 1304 gelangen können.

30 Auf Haltebereichen an den ersten und zweiten Elektroden sind DNA-Sondenmoleküle 1309 immobilisiert, die mit den entsprechenden zu erfassenden DNA-Strängen vorgegebener Sequenz hybridisieren können.

35 Wie Fig.13 zu entnehmen ist, bilden sich aufgrund der einander gegenüberliegenden, im wesentlichen parallel zueinander ausgerichteten Oberflächen der zweiten Elektrode 1308 bzw.

der ersten Elektrode 1303, an denen die Haltebereiche zum Halten der DNA-Sondenmoleküle 1309 vorgesehen sind, bei Anlegen eines elektrischen Feldes zwischen der ersten Elektrode 501 und der zweiten Elektrode 502 im wesentlichen ungekrümmte Feldlinien aus.

Fig.14 zeigt einen Biosensor 1400 gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung.

- 10 Der Biosensor 1400 gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel entspricht im wesentlichen dem oben erläuterten und in Fig.13 gezeigten Biosensor 1300 mit dem Unterschied, dass an Seitenwänden des ersten Schenkels 1301 der zweiten Elektrode 502 keine Haltebereiche mit immobilisierten DNA-Sondenmolekülen
- 15 1309 vorgesehen sind, sondern dass die Oberfläche 1401 der ersten Schenkel 1301 der zweiten Elektrode 502 mit Isolatormaterial der Isolatorschicht 503 oder einer weiteren isolierenden Schicht bedeckt sind.
- 20 Gemäß dem in Fig.14 gezeigten Ausführungsbeispiel sind Haltebereiche auf der ersten und auf der zweiten Elektrode 501, 502 demnach lediglich an unmittelbar sich gegenüberliegenden Oberflächen der Elektroden, d.h. an der Oberfläche 1402 des zweiten Schenkels der zweiten Elektrode 502, und an der Oberfläche 1403 der ersten Elektrode 501.

In den Fig.15a bis Fig.15g sind einzelne Verfahrensschritte zum Herstellen der ersten Elektrode 501 und der zweiten Elektrode 502 in den Biosensoren 1300, 1400 dargestellt.

30

In die Isolatorschicht 503 als Substrat, gemäß dem Ausführungsbeispiel aus Siliziumoxid wird unter Verwendung einer Maskenschicht, beispielsweise aus Photolack, eine Struktur in die Isolatorschicht 503 geätzt, deren Form der zu bildenden ersten Elektrode 501 entspricht.

35

Nach Entfernen der Maskenschicht durch Veraschen oder durch ein nasschemisches Verfahren wird ganzflächig eine Schicht aus dem gewünschten Elektrodenmaterial auf der Isolatorschicht 503 aufgebracht derart, dass die zuvor geätzte Struktur 1501 (vgl. Fig.15a) zumindest vollständig gefüllt ist, wobei die Struktur 1501 auch überfüllt sein kann (vgl. Fig.15b).

In einem weiteren Schritt wird mittels eines chemisch-mechanischen Polierverfahrens (vgl. Fig.15c) das außerhalb der vorgefertigten Struktur 1501 sich befindende Elektrodenmaterial 1502, vorzugsweise Gold, entfernt.

Nach Beendigung des chemisch-mechanischen Polierverfahrens ist somit die erste Elektrode 501 bündig in die Isolatorschicht 503 eingebettet.

Elektrodenmaterial 1502 außerhalb, d.h. zwischen den weiteren zweiten Elektroden 502 bzw. zwischen den ersten Elektroden 501 ist restfrei entfernt.

Auf die erste Elektrode 501 kann ferner eine Deckschicht 1503 beispielsweise aus Siliziumnitrid aufgebracht werden mittels eines geeigneten Beschichtungsverfahrens wie beispielsweise einem CVD-Verfahren, einem Sputterverfahren oder einem Aufdampfverfahren (vgl. Fig.15d).

Fig.15e zeigt mehrere erste Elektroden 1501 aus Gold, die nebeneinander in die Isolatorschicht 503 eingebettet sind und die darauf sich befindende Deckschicht 1503.

In einem weiteren Schritt (vgl. Fig.15f) wird auf der Deckschicht 1503 eine zweite Elektrodenschicht 1504 aufgebracht.

Nach erfolgter Strukturierung einer Maskenschicht 1506 aus beispielsweise Siliziumoxid, Siliziumnitrid oder Fotolack, in der die gewünschten Öffnungen 1505 zwischen den zweiten Elek-

troden berücksichtigt sind, die aus der zweiten Elektroden-
schicht 1504 gebildet werden soll, werden die gewünschten
Hohlräume 1304 gemäß der in Fig.12 oder Fig.13 dargestellten
Biosensoren 1300, 1400 in der zweiten Elektroden-
schicht 1504
5 über der ersten Elektroden-
schicht 1502 mit einem isotropen
Ätzverfahren gebildet (Trockenätzverfahren, z.B. in einem
Downstream-Plasma, oder Nassätzverfahren) (vgl. Fig.15g).

Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass die Deck-
schicht 1503 nicht unbedingt erforderlich ist, jedoch vor-
10 teilhaft ist, um die ersten Elektroden 501 vor Anätzung bei
der Bildung des Hohlraums 1304 zu schützen.

In einer alternativen Ausführungsform kann die T-förmige
15 Struktur der zweiten Elektrode 502 gebildet werden, indem
nach Bilden der ersten Elektrode 501 gemäß dem oben beschrie-
benen Verfahren eine weitere Isolatorschicht mittels eines
CVD-Verfahrens oder eines anderen geeigneten Beschichtungs-
verfahrens auf die erste Isolatorschicht oder, bei Existenz
20 der Deckschicht 1503 auf der Deckschicht 1503 gebildet wird.
Anschließend werden in der Deckschicht 1503 entsprechende
Gräben gebildet, die zur Aufnahme des ersten Schenkels 1301
der T-förmigen Struktur der zweiten Elektrode 502 dienen.
Diese Gräben werden mit dem Elektrodenmaterial Gold gefüllt
25 und gemäß dem Damascene-Verfahren wird mittels eines che-
misch-mechanischen Polierens das Elektrodenmaterial entfernt,
das sich in dem Graben und oberhalb der zweiten Isolator-
schicht gebildet hat, bis auf eine vorgegebene Höhe, die der
Höhe der zweiten Schenkel 1302 der T-förmigen zweiten Elek-
trode 502 entspricht.
30

Mittels Photolithographie wird die Öffnung 1305 zwischen den
zweiten Elektroden 502 gebildet und anschließend wird das
Isolatormaterial mittels eines Trockenätzverfahrens in einem
35 Downstream-Plasma aus dem Volumen, das als Hohlraum 1304 aus-
gebildet werden soll, zumindest teilweise entfernt.

Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die oben beschriebenen Ausführungsformen nicht auf eine Elektrode beschränkt ist, deren Haltebereich mittels Gold realisiert ist. Es können alternativ Elektroden mit Materialien in den Haltebereichen be-

5 schichtet sein, beispielsweise mit Siliziummonoxid oder Siliziumdioxid, die mit den oben dargestellten Amin-, Acetoxy-, Isocyanat-, Alkysilanresten eine kovalente Verbindung bilden können zum immobilisieren von Sondenmolekülen, in dieser Variante insbesondere zum immobilisieren von Liganden.

In diesem Dokument sind folgende Veröffentlichungen zitiert:

- 5 [1] R. Hintsche et al., Microbiosensors Using Electrodes Made
in Si-Technology, Frontiers in Biosensorics, Fundamental
Aspects, edited by F. W. Scheller et al., Dirk Hauser
Verlag, Basel, S. 267 - 283, 1997
- 10 [2] N.L. Thompson, B.C. Lagerholm, Total Internal Reflection
Fluorescence: Applications in Cellular Biophysics, Current
Opinion in Biotechnology, Vol. 8, S. 58 - 64, 1997
- [3] P. Cuatrecasas, Affinity Chromatography, Annual Revision
Biochem, Vol. 40, S. 259 - 278, 1971
- 15 [4] P. van Gerwen, Nanoscaled Interdigitated Electrode Arrays
for Biochemical Sensors, IEEE, International Conference
on Solid-State Sensors and Actuators, Chicago, S.907 -
910, 16. - 19. Juni 1997

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erfassen von makromolekularen Biopolymeren mittels einer Elektrodenanordnung, die eine erste Elektrode und eine zweite Elektrode aufweist, wobei die erste Elektrode mit ersten Molekülen versehen ist, die makromolekulare Biopolymere eines ersten Typs binden können und wobei die zweite Elektrode mit zweiten Molekülen versehen ist, die makromolekulare Biopolymere eines zweiten Typs binden können,
- bei dem eine erste elektrische Messung an den Elektroden durchgeführt wird, wobei bei der elektrischen Messung die ersten Moleküle und/oder die zweiten Moleküle auf den Elektroden vorhanden sind oder nicht,
- bei dem ein Medium mit den Elektroden in Kontakt gebracht wird derart, dass
- a) für den Fall, dass sich in dem Medium makromolekulare Biopolymere des ersten Typs befinden, sich diese an die ersten Moleküle binden können,
- b) für den Fall, dass sich in dem Medium makromolekulare Biopolymere des zweiten Typs befinden, sich diese an die zweiten Moleküle binden können,
- bei dem nicht gebundene erste Moleküle oder zweite Moleküle von der jeweiligen Elektrode entfernt werden,
- bei dem anschließend eine zweite elektrische Messung zwischen den Elektroden durchgeführt wird,
- bei dem abhängig von einem Vergleich der Ergebnisse der zwei elektrischen Messungen an den Elektroden die makromolekularen Biopolymere erfasst werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
- bei dem als makromolekulare Biopolymere Proteine oder Peptide erfasst werden, und
- bei dem als erste und zweite Moleküle Liganden verwendet werden, die die Proteine oder Peptide spezifisch binden können.
3. Verfahren nach Anspruch 2,

bei dem nicht gebundene erste Liganden oder zweite Liganden von der jeweiligen Elektrode entfernt werden, indem ein Material mit den Elektroden in Kontakt gebracht wird, das imstande ist, die chemische Verbindung zwischen dem Ligand und der Elektrode zu hydrolysieren.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem das Material, das mit den Elektroden in Kontakt gebracht wird, ein Enzym ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Enzym, das in mit den Elektroden in Kontakt gebracht wird, eine Carboxylester-Hydrolase (Esterase) ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1,

- bei dem als makromolekulare Biopolymere eines ersten Typs DNA-Einzelstränge einer vorgegebenen ersten Sequenz erfasst werden sollen,
- bei dem als makromolekulare Biopolymere eines zweiten Typs DNA-Einzelstränge einer vorgegebenen zweiten Sequenz erfasst werden sollen,
- bei dem als erste Moleküle DNA-Sondenmoleküle mit zu der ersten Sequenz komplementärer Sequenz verwendet werden, und
- zweite Moleküle DNA-Sondenmoleküle mit zu der zweiten Sequenz komplementärer Sequenz verwendet werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6,

bei dem nicht gebundene erste DNA Moleküle oder zweite DNA Moleküle von der jeweiligen Elektrode entfernt werden, indem ein Enzym mit Nukleaseaktivität mit den Elektroden in Kontakt gebracht wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

bei dem als Enzym mit Nukleaseaktivität mindestens einer der folgenden Stoffe verwendet wird:

- Nuklease aus Mung-Bohnen,

- Nuklease P1,
- Nuklease S1, oder
- DNA-Polymerasen, die aufgrund ihrer
5' → 3' Exonukleaseaktivität oder ihrer
3' → 5' Exonukleaseaktivität imstande sind, einzelsträn-
gige DNA abzubauen.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
bei dem als Medium ein Elektrolyt verwendet wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
bei dem bei der ersten elektrischen Messung und der zweiten
elektrischen Messung die Kapazität zwischen den Elektroden
gemessen wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
bei dem bei der ersten elektrischen Messung und der zweiten
elektrischen Messung der elektrische Widerstand der Elektro-
den gemessen wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
bei dem bei der ersten elektrischen Messung und der zweiten
elektrischen Messung eine Impedanzmessung durchgeführt.

1/12

FIG 1A

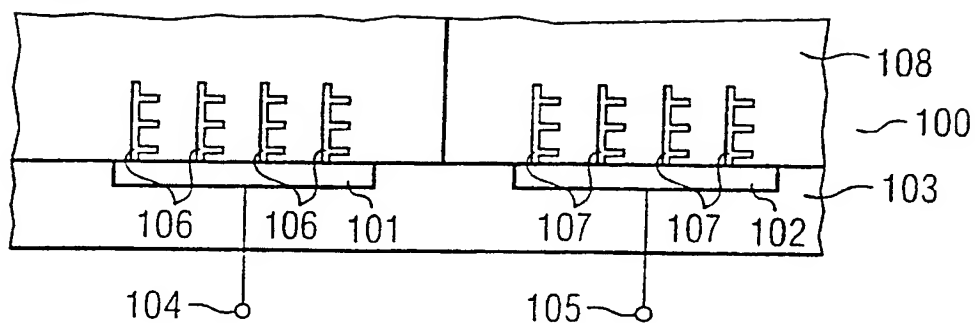


FIG 1B

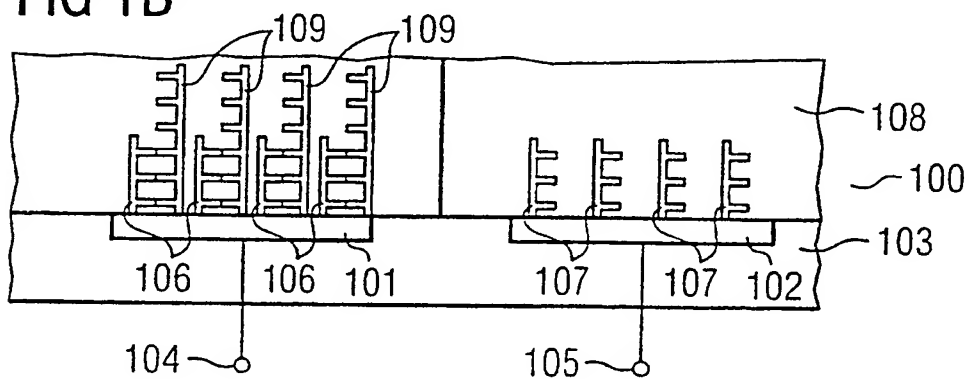
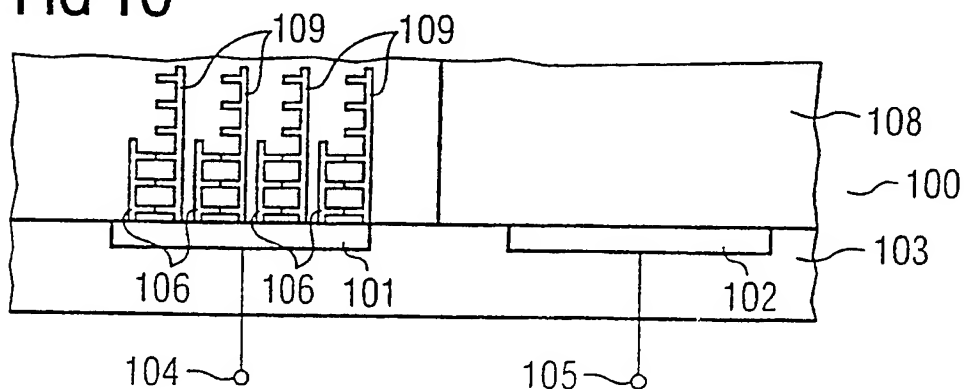


FIG 1C



2/12

FIG 2A

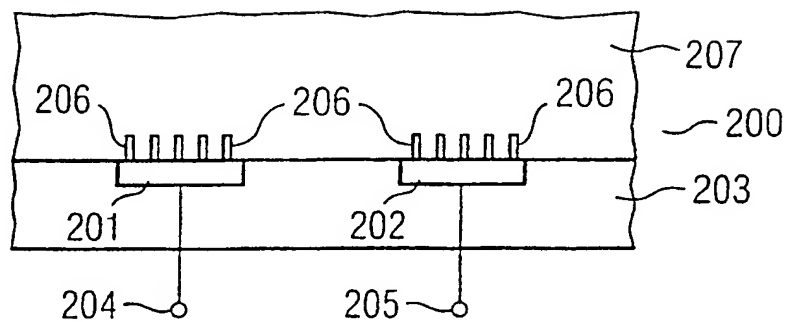


FIG 2B

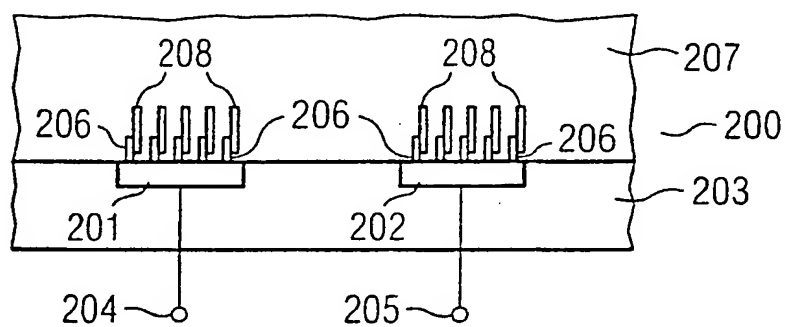
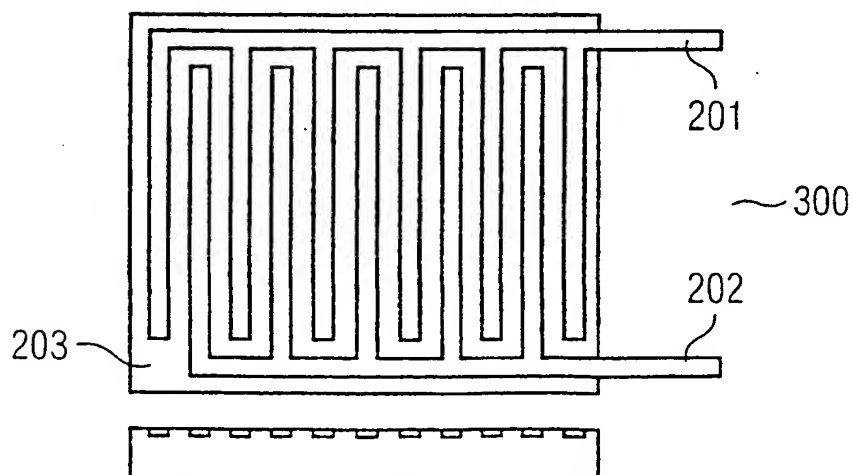


FIG 3



3/12

FIG 4

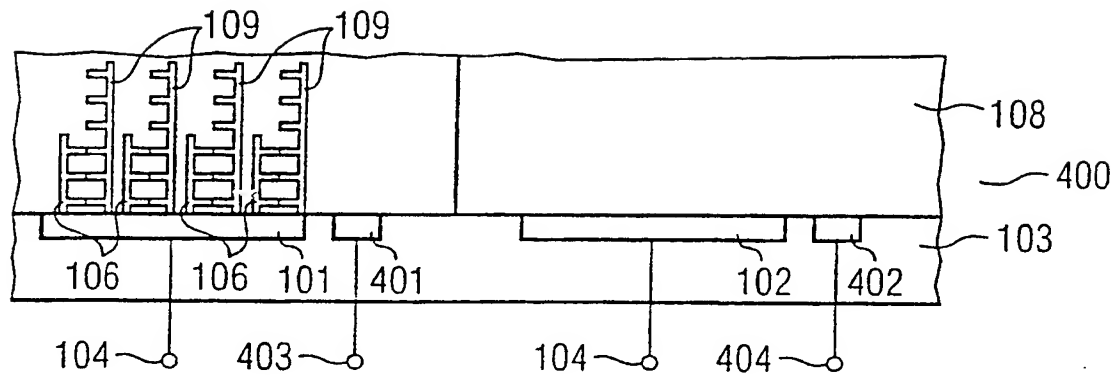
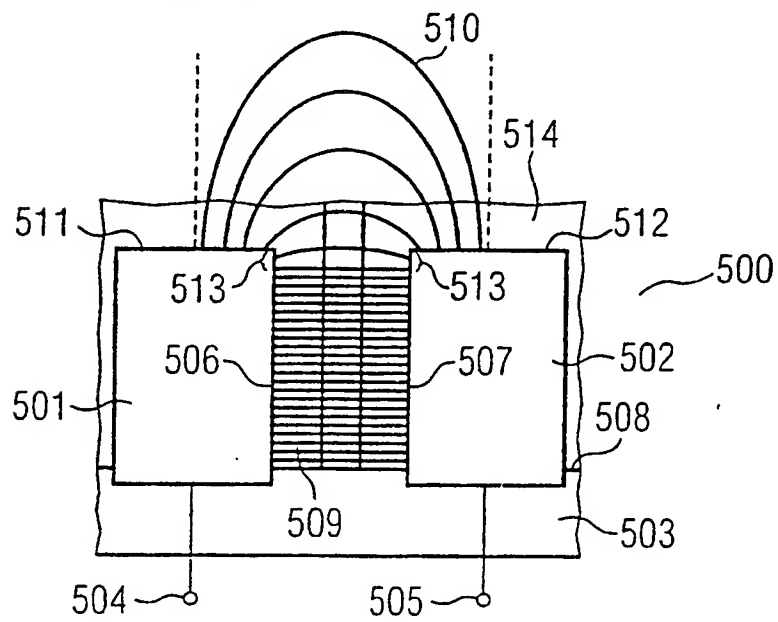
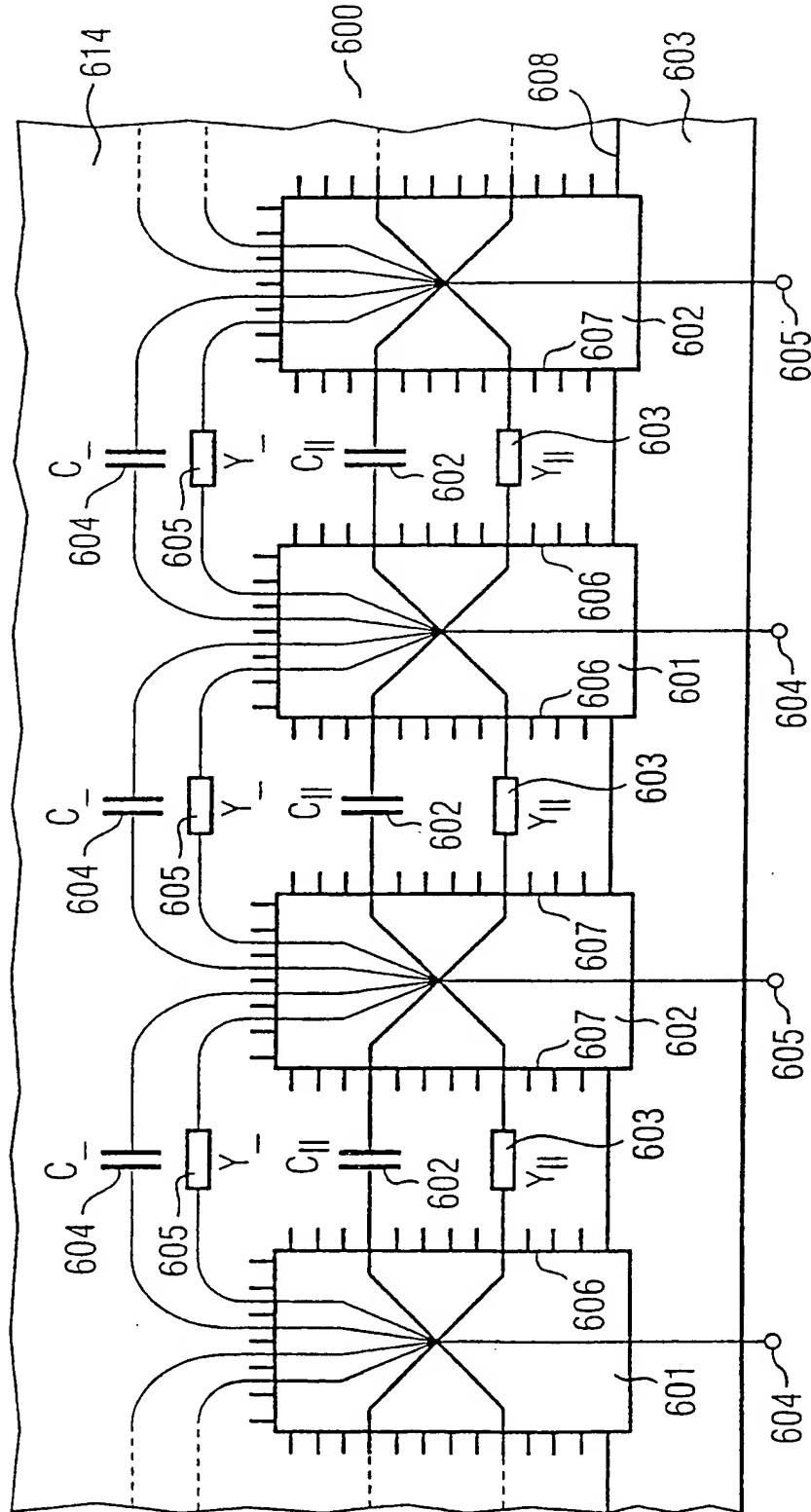


FIG 5



4/12

FIG 6



5/12

FIG 7A

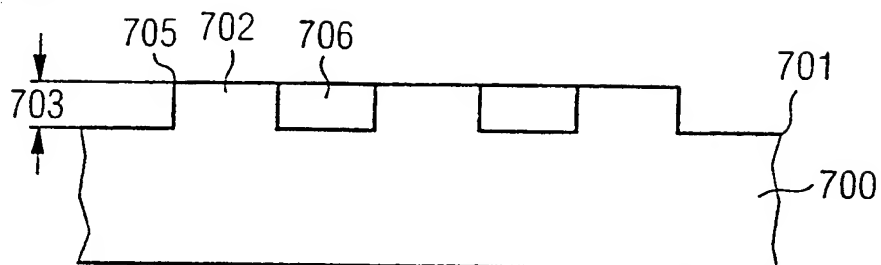


FIG 7B

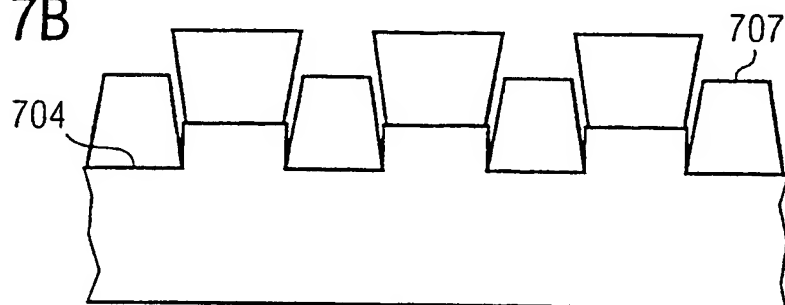


FIG 7C

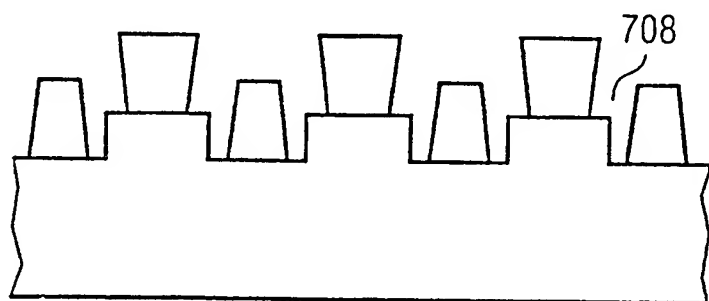
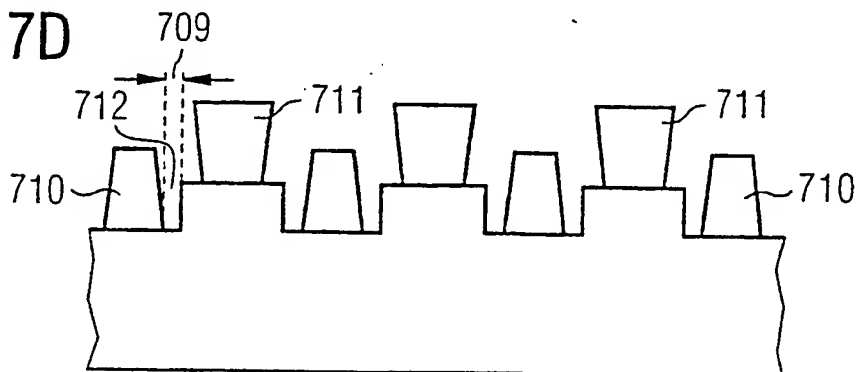


FIG 7D



6/12

FIG 8A

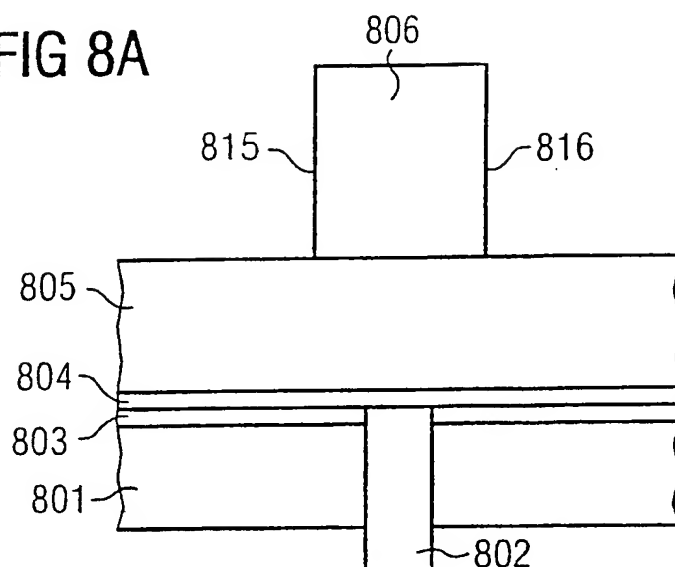


FIG 8B

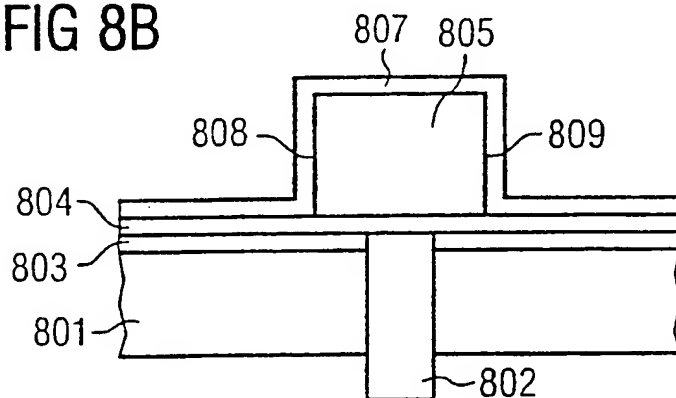
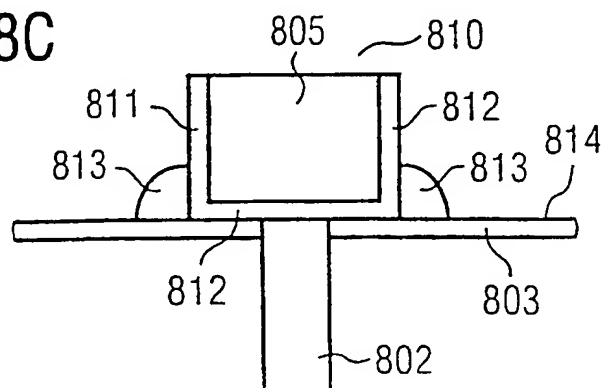


FIG 8C



7/12

FIG 9A

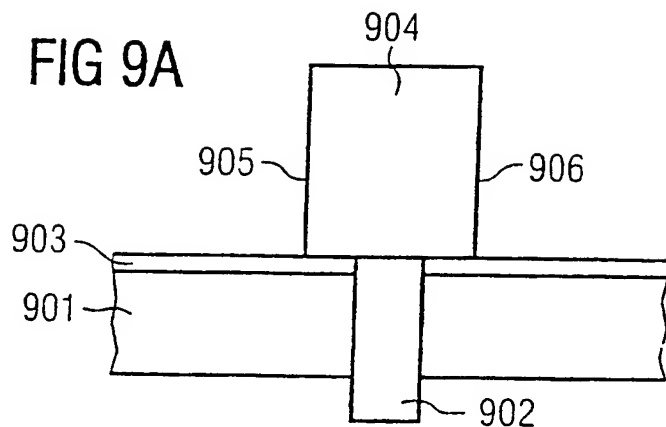


FIG 9B

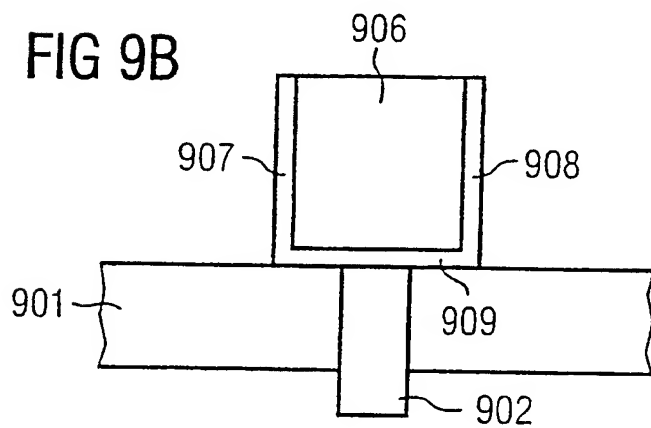
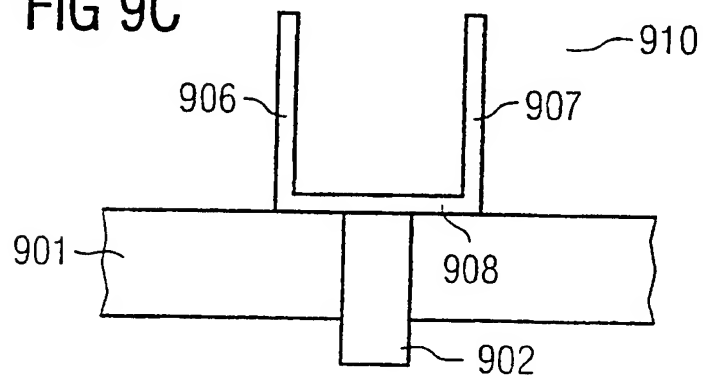


FIG 9C



8/12

FIG 10A

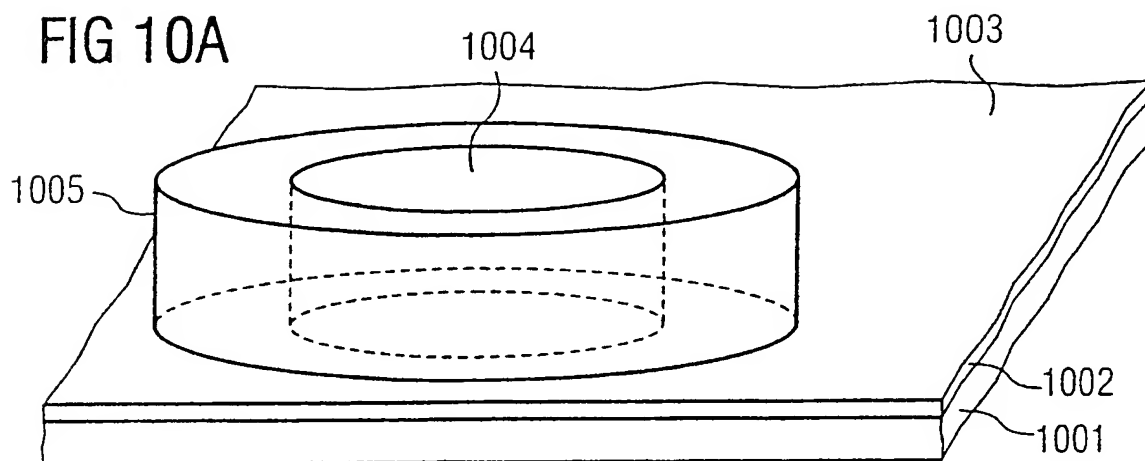


FIG 10B

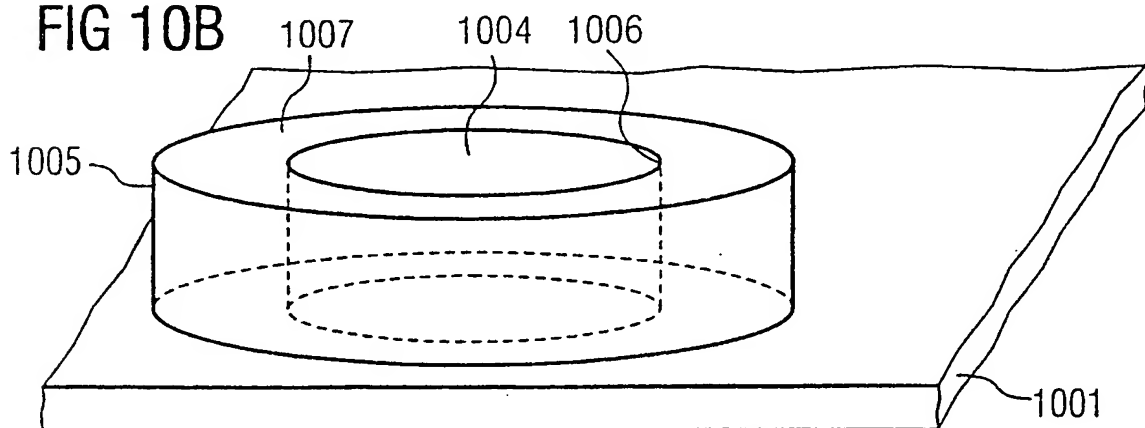
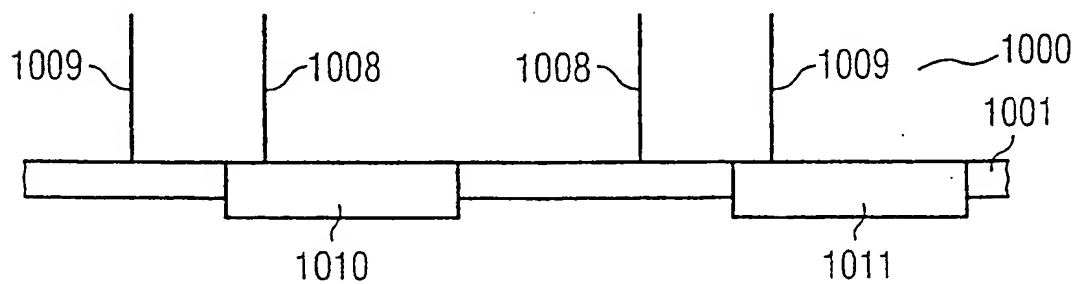


FIG 10C



9/12

FIG 11

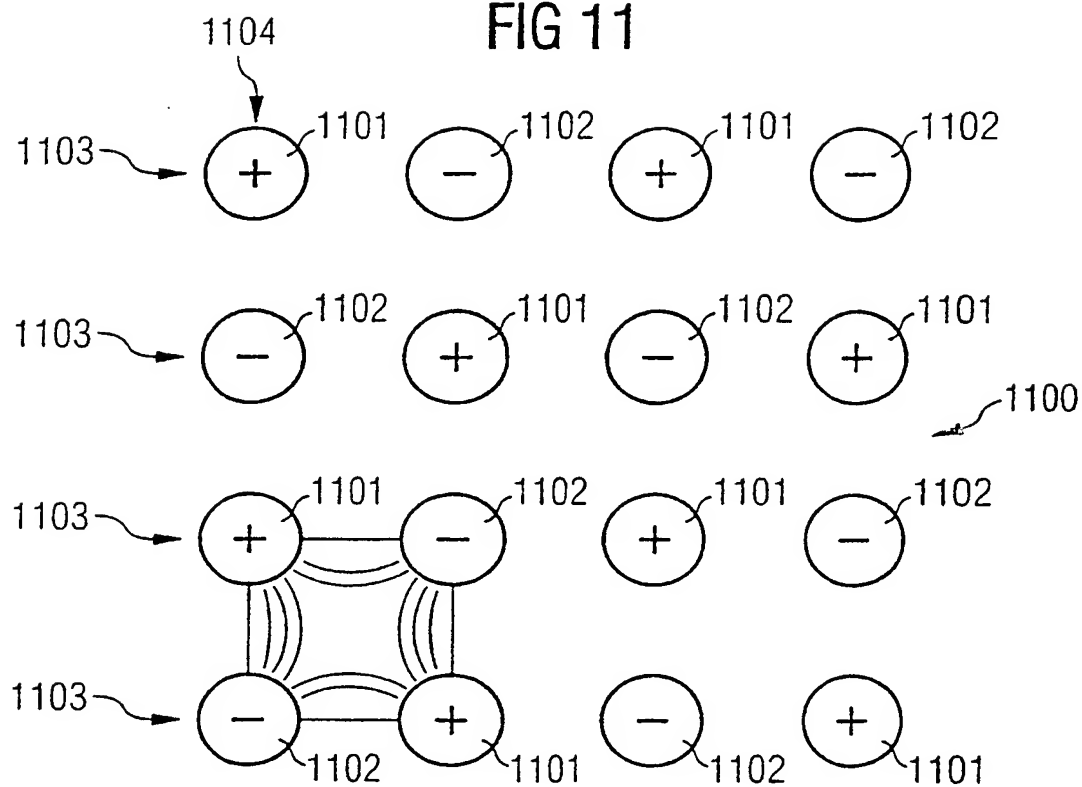
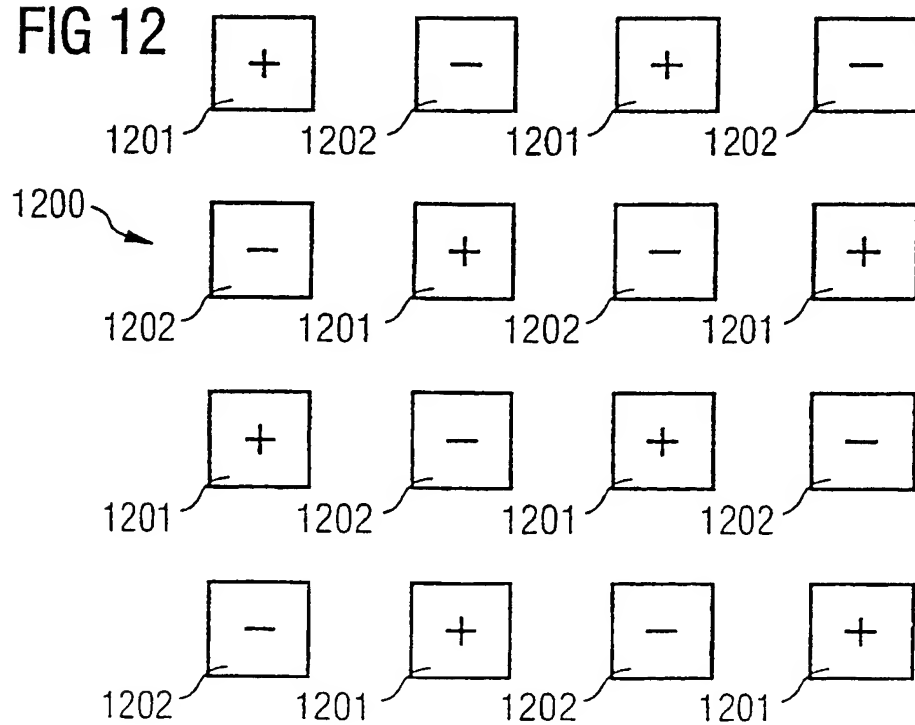


FIG 12



11/12

FIG 15A

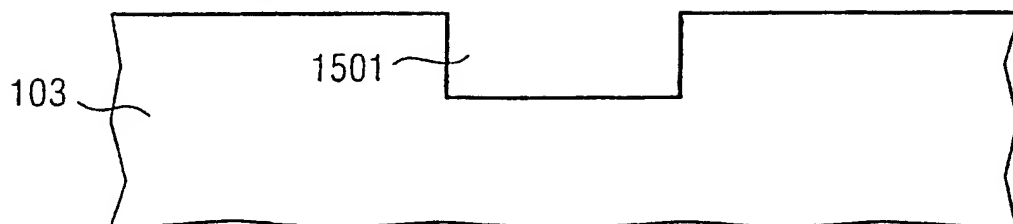


FIG 15B

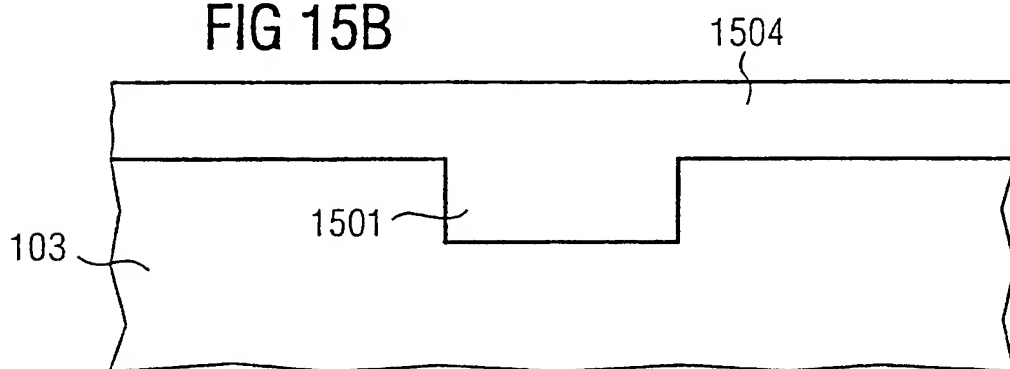


FIG 15C

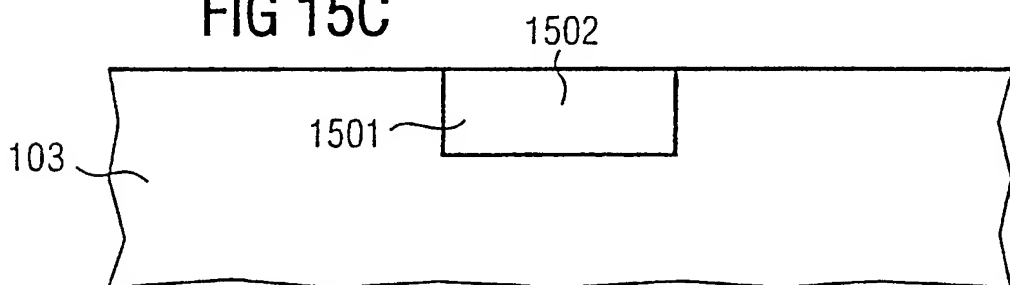
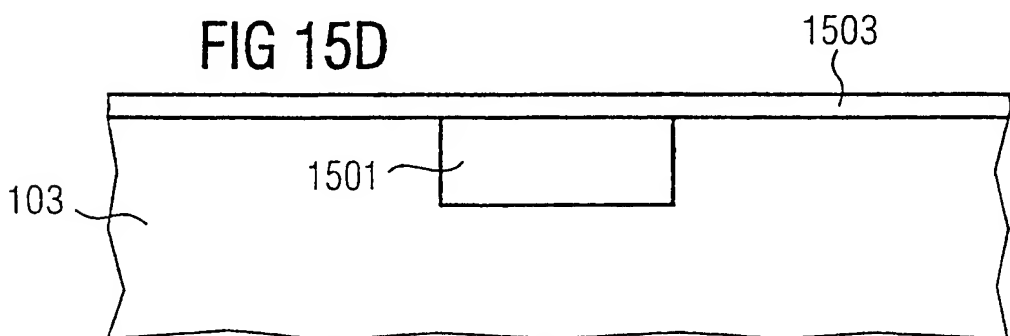


FIG 15D



12/12

FIG 15E

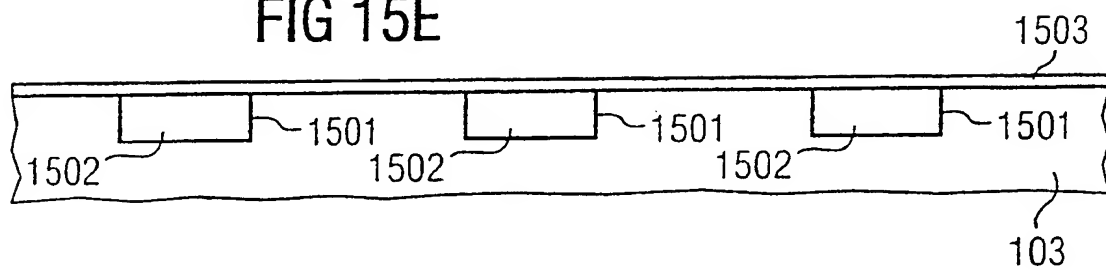


FIG 15F

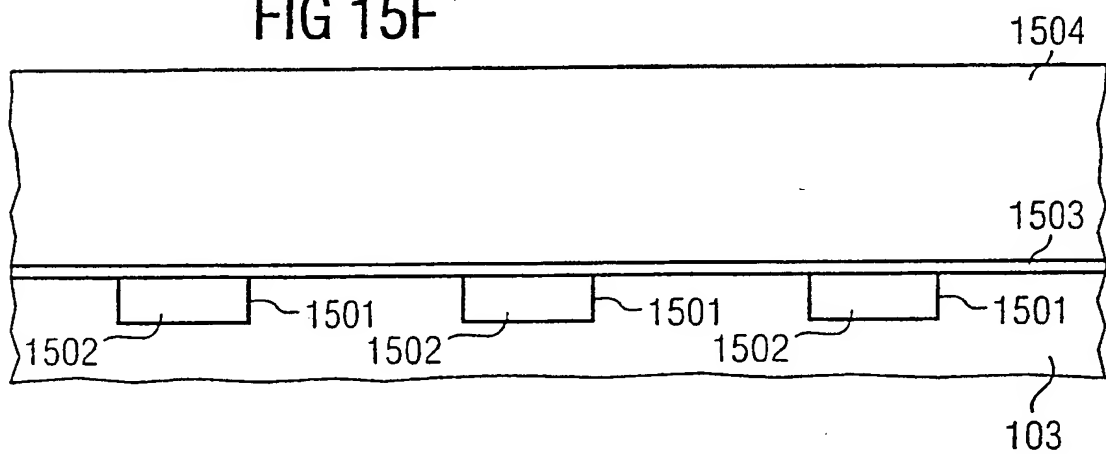
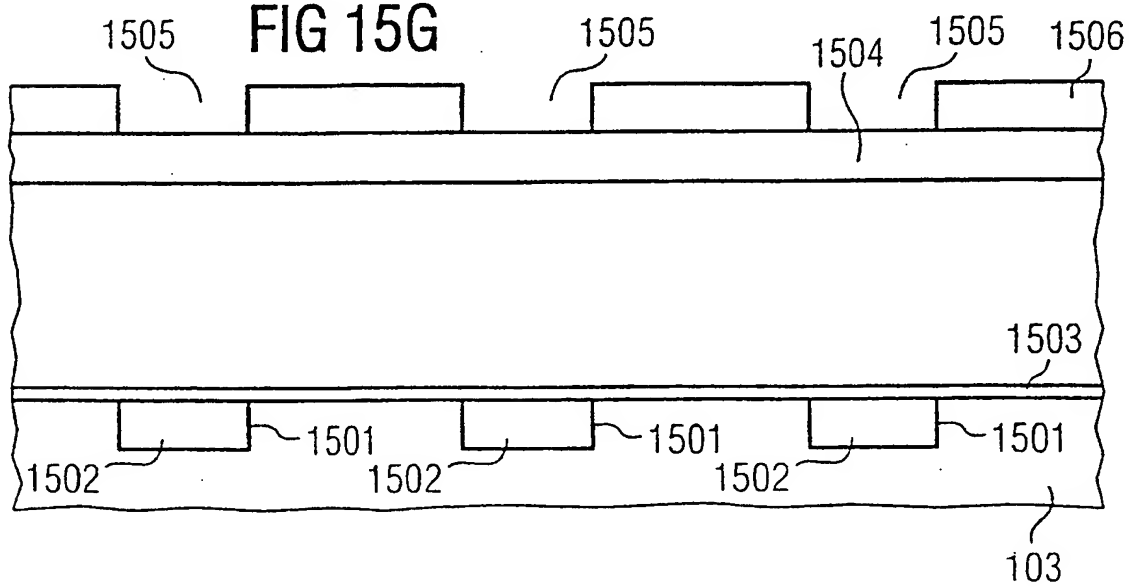


FIG 15G



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

PCT

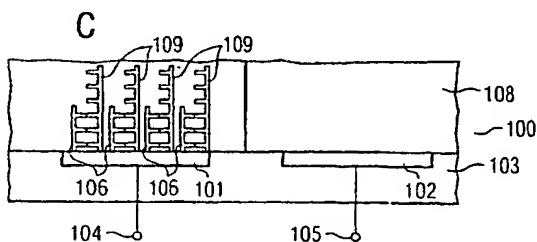
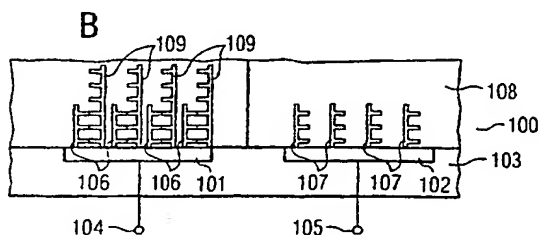
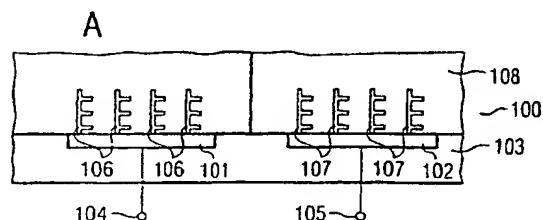
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/75151 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
G01N 27/327, 33/543 US): INFINEON TECHNOLOGIES AG [DE/DE]; St.-
Martin-Strasse 53, 81669 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01244 (72) Erfinder; und
- (22) Internationales Anmeldedatum: 29. März 2001 (29.03.2001) (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFMANN, Franz
[DE/DE]; Herbergstrasse 25 B, 80995 München (DE).
LUYKEN, Richard, Johannes [DE/DE]; Boecklerweg
28, 81825 München (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: VIERING, JENTSCHURA & PARTNER;
Steinsdorfstrasse 6, 80504 München (DE).
- (30) Angaben zur Priorität: 100 15 819.6 30. März 2000 (30.03.2000) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MACROMOLECULAR BIOPOLYMERS BY MEANS OF AN ELECTRODE
ARRANGEMENT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERFASSEN VON MAKROMOLEKULAREN BIOPOLYMEREN MITTELS EINER
ELEKTRODENANORDNUNG



(57) Abstract: The invention relates to electrodes which are provided with molecules that can bind macromolecular biopolymers. A first electric measurement is carried out on the electrodes. A medium is contacted to said electrodes in such a way that biopolymers can specifically bind to first molecules or second molecules which are applied to the electrodes, when macromolecular biopolymers are present in the medium. Unbound first or second molecules are removed from the respective electrode and a second electric measurement is carried out. The macromolecular biopolymers are detected according to the measurements.

(57) Zusammenfassung: Die Elektroden sind mit Molekülen versehen, die makromolekulare Biopolymere binden können. Es wird eine erste elektrische Messung an den Elektroden durchgeführt. Ein Medium wird mit den Elektroden in Kontakt gebracht, derart, dass für den Fall, dass sich in dem Medium makromolekulare Biopolymere befinden, sich diese an auf den Elektroden aufgebrachte erste Moleküle oder zweite Moleküle spezifisch binden können. Nicht gebundene erste oder zweite Moleküle werden von der jeweiligen Elektrode entfernt und es wird eine zweite elektrische Messung durchgeführt. Abhängig von den Messungen werden die makromolekularen Biopolymere erfasst.



WO 01/75151 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

18. April 2002

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 01/01244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 G01N27/327 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 859 229 A (GIST BROCADES BV) 19 August 1998 (1998-08-19) abstract	1
A	US 5 658 732 A (EBERSOLE RICHARD CALVIN ET AL) 19 August 1997 (1997-08-19) abstract	1
A	EP 0 962 773 A (JONES MARK HOWARD) 8 December 1999 (1999-12-08) abstract	1
A	WO 95 24641 A (ANDCARE INC) 14 September 1995 (1995-09-14) abstract	1
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents:**

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 February 2002

Date of mailing of the international search report

15/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/01244

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	<p>WO 01 61053 A (SAWYER JAYMIE ROBIN ;ZHANG PEIMING (US); CHOONG VI EN (US); LI CHA) 23 August 2001 (2001-08-23) abstract</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/01244

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0859229	A	19-08-1998	EP 0859229 A1	19-08-1998
			AU 5301598 A	13-08-1998
			US 6100045 A	08-08-2000
<hr/>				
US 5658732	A	19-08-1997	CA 2066643 A1	05-04-1991
			DE 69010506 D1	11-08-1994
			DE 69010506 T2	22-12-1994
			EP 0494896 A1	22-07-1992
			JP 5500715 T	12-02-1993
			WO 9105261 A1	18-04-1991
<hr/>				
EP 0962773	A	08-12-1999	EP 0962773 A1	08-12-1999
			AU 4372199 A	20-12-1999
			WO 9963347 A2	09-12-1999
			EP 1093584 A2	25-04-2001
<hr/>				
WO 9524641	A	14-09-1995	US 5391272 A	21-02-1995
			WO 9524641 A1	14-09-1995
<hr/>				
WO 0161053	A	23-08-2001	AU 3857301 A	27-08-2001
			WO 0161053 A2	23-08-2001
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01244

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 G01N27/327 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 859 229 A (GIST BROCADES BV) 19. August 1998 (1998-08-19) Zusammenfassung ---	1
A	US 5 658 732 A (EBERSOLE RICHARD CALVIN ET AL) 19. August 1997 (1997-08-19) Zusammenfassung ---	1
A	EP 0 962 773 A (JONES MARK HOWARD) 8. Dezember 1999 (1999-12-08) Zusammenfassung ---	1
A	WO 95 24641 A (ANDCARE INC) 14. September 1995 (1995-09-14) Zusammenfassung ---	1
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeteilt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Februar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/02/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P B 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

INTERNATIONALFR RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01244

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	<p>WO 01 61053 A (SAWYER JAYMIE ROBIN ;ZHANG PEIMING (US); CHOONG VI EN (US); LI CHA)</p> <p>23. August 2001 (2001-08-23)</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONALEP RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01244

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0859229	A	19-08-1998	EP	0859229	A1	19-08-1998
			AU	5301598	A	13-08-1998
			US	6100045	A	08-08-2000
US 5658732	A	19-08-1997	CA	2066643	A1	05-04-1991
			DE	69010506	D1	11-08-1994
			DE	69010506	T2	22-12-1994
			EP	0494896	A1	22-07-1992
			JP	5500715	T	12-02-1993
			WO	9105261	A1	18-04-1991
EP 0962773	A	08-12-1999	EP	0962773	A1	08-12-1999
			AU	4372199	A	20-12-1999
			WO	9963347	A2	09-12-1999
			EP	1093584	A2	25-04-2001
WO 9524641	A	14-09-1995	US	5391272	A	21-02-1995
			WO	9524641	A1	14-09-1995
WO 0161053	A	23-08-2001	AU	3857301	A	27-08-2001
			WO	0161053	A2	23-08-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)